



**Caractérisation pré-clinique d'un effet de type
antidépresseur de la 3β methoxyprégnénolone
(MAP4343), un dérivé de la prégnénolone ayant pour
cible potentielle le système microtubulaire**

Lucie Parésys

► **To cite this version:**

Lucie Parésys. Caractérisation pré-clinique d'un effet de type antidépresseur de la 3β methoxyprégnénolone (MAP4343), un dérivé de la prégnénolone ayant pour cible potentielle le système microtubulaire. Pharmacologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T014 . tel-01297055

HAL Id: tel-01297055

<https://theses.hal.science/tel-01297055>

Submitted on 2 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 : BIOSIGNE

Laboratoires : MAPREG / INSERM UMR 788

THÈSE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Lucie Parésys

**Caractérisation pré-clinique d'un effet de type antidépresseur de la
3 β -methoxyprégnénolone (MAP4343), un dérivé de la prégnénolone ayant
pour cible potentielle le système microtubulaire**

Date de soutenance : 16 Mars 2015

Composition du jury :

Directeur de thèse : Dr. Michael Schumacher , directeur de l'UMR,
Kremlin-Bicêtre

Rapporteurs : Pr. Michel Hamon, DRE INSERM, Professeur de l'Université Pierre et Marie Curie,
Paris
Dr. Marie-Christine Pardon, Lecturer in Translational Neuroscience,
Faculty of Medicine & Health Sciences, University of Nottingham

Examineurs : Dr Sylvie Granon, responsable de l'équipe « Neurobiologie de la prise de décision »,
UMR CNRS-Université Paris Sud
Dr. Annie Andrieux, responsable de l'équipe « Physiopathologie du cytosquelette »,
INSERM UMR 836, Institut des Neurosciences de Grenoble

Membres invités : Dr Nicolas Froger, responsable scientifique depuis Mars 2014, Mapreg, Le Kremlin
Bicêtre
Dr Massimiliano Bianchi, responsable scientifique à Mapreg avant Janvier
2015, Transpharmation, Dublin, Irlande

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Dr. Michael Schumacher pour avoir cru en moi et avoir fait confiance en mon projet de thèse. Je remercie également le Pr. Baulieu pour avoir accepté et soutenu ce travail de recherche au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Nicolas Froger pour m'avoir soutenu à la fin de cette expérience si particulière et pour m'avoir apporté son aide précieuse.

J'adresse un remerciement particulier au Dr. Bianchi. Je suis passée par tous les discours qu'il est possible de construire entre un chef et son étudiante. Le temps a fait que l'esprit a changé. Aujourd'hui il ne m'apparaît plus de discours. Le souvenir de la passion partagée est une délectation immense et unique, un plaisir si précieux que je tiens à conserver. Je te souhaite du bonheur, Max.

Je remercie également les différents membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie mes rapporteurs le Dr. Marie-Christine Pardon et le Pr. Michel Hamon et mes examinatrices le Dr. Sylvie Granon et le Dr. Annie Andrieux.

Remerciements tout particuliers,

A Natty, Jenni, Juju, Vinz' et Laz'. Vous êtes des anges. Quelle grâce de vous avoir eu près de moi chaque jour de dur labeur ! C'est une chance sans laquelle je n'aurais sûrement pas pu aller au bout de ma route...

A mes chers camarades de l'unité 788 et du deuxième étage qui ont été là pour discuter, écouter, conseiller, reconforter et pour m'inspirer : Philipe, Antoine, Gerry, Dominique, Gislaine, Rachida, Brigitte, Patricia, Magalie, Béa, Julien, Kevin, Maryse, Monique, Martine et les autres. A Jean-Paul, merci Jean-Paul pour ta sincérité, ta compassion et ton amour pour les Hommes... A Laura P. Laura, tu es belle de sincérité, ne change rien. Je pense fort à toi loin d'ici... A Marie. Puisses-tu un jour trouver le réconfort en te regardant comme tu es, c'est-à-dire quelqu'un d'exceptionnel, de fort et de précieux.

A Arlette pour nos discussions scientifiques et passionnées...

A Pilou, Steeve, Amel, et les autres. Courage les gars ! Tous dans la même galère, mais aucune destination... Ensemble on est, au moins, moins malheureux. N'est-ce pas ça le bonheur ?

A Quentin. Merci de m'avoir aidé techniquement et psychiquement à construire seule ma maison... Mon estime pour toi est immense, ma reconnaissance est extrême et profonde. Ma requête est on ne peut plus sincère, je t'en conjure : reste mon ami encore et toujours !

A Mila, Benjamin, Anna et Lara. Un million de mercis pour avoir apporté tout ce dont vous étiez capable en réconfort, en conseils, en éloge, mais aussi en discussions passionnées, en bonheur partagé et en moments inoubliables.

A Marianne, loin des yeux, mais tout près de mon cœur...

A Claire, mon amie... Claire dans la galère je t'emmène. Dans la galère, si il n'y qu'une personne que je dois emmener avec moi, c'est toi. Parce que tu ne me demandes rien, parce que ton courage est

inouï, parce qu'on se comprend si bien... Je te confierais ma vie dans les moments où elle nous lâche parfois. Ma confiance est entière, mon cœur est sincère. Avec toi, je suis bien, je suis moi.

A Nanou. Ton mode de vie est plus fort que le mien, l'image me plait, je m'en inspire...

A Flo, ... Une conseillère ? Une protectrice ? Une compagne de soirée ? Une amie fidèle ? Merci de m'avoir supportée quand je me plaignais. Merci de t'être soucieuse de moi quand je déprimais. Merci de m'avoir protégé quand je souffrais... Merci pour ces dîners si précieux...

A Gilles. Tu as été là quand le ciel était gris... J'espère pouvoir t'apporter maintenant un peu du soleil que j'ai conquis...

A Jenni, Mailys, Caro, Guigui, Fleur, Laurent, Carole et la team compet', Manon, Sachou, Kco, Flo, et les autres ainsi qu'à mes élèves adorés, Soso, Oriane, Joey, ... Vous m'avez apporté l'équilibre dont j'avais vraiment besoin.

A Laetitia, Gaelle et les cavaliers de la guiche pour leur soutien et le bonheur partagé.

Aux trois Pignons, à Philippe et à Thomas pour l'équilibre que vous m'apportez qui me rassure et m'inspire... Au soutien, au réconfort, aux discussions infinies. A Anne, à Dédé, à tous les cavaliers... A Luc pour ton soutien et ton coaching ! A Eliane pour ta passion, nos discussions et surtout... ton réconfort. Et à tant d'autres des Trois Pignons, Alex, Patty, Sandrine, Eric...

A Rose pour ton soutien inconditionnel, à Richard et à Rébecca.

A Nico, à Christelle, à Lilian et aux Lemoigne pour les trop rares moments de bonheur que vous m'avez procuré ! A leur amitié et leur immense générosité !

A mes cousins, mes cousines, à ma tante, à mon tonton, à Claudine pour leur présence dans les moments durs qui, hélas, ont traversé nos vies durant ces années.

A Mamie qui est partie pendant cette expérience. Tu m'as toujours donné la force d'aller au bout, tu m'as interdit la lâcheté et cela restera au fond de moi, à jamais. A Papi qui est parti aussi pendant cette période. Merci de m'avoir soutenu à ta façon...

A Papa. Tu es un être exceptionnel et je m'inspire de toi chaque jour pour être meilleure... Je suis ta première adoratrice, ta première fan et, je l'espère, ta continuité.

A Maman. C'est parce que je sais que tu m'aimes que je fais tout ça...

A Flora. Continue de garder la tête haute, tu as raison. Tu es ma sœur et tu es incroyable !

A tous pour m'avoir aiguillé explicitement ou implicitement, consciemment ou inconsciemment, volontairement ou involontairement par vos actes, vos propos, vos désirs, vos choix, m'apportant ainsi votre expérience, votre recul et votre vision du monde, mais aussi vos doutes, vos masques, vos détournements et vos embuscades, suscitant ma réflexion, mon cheminement et construisant finalement le développement personnel nécessaire au bouleversement interne et à la révolution inouïe qui m'ont transformée.

Déjà inscrit dans mon passé car le futur est imminent, ce moment restera particulier et participera je le sais à l'édification de cette ouvrage mystérieux et infini qu'est la vie.

*«C'est bien la pire peine
De ne savoir pourquoi
Sans amour et sans haine
Mon cœur a tant de peine!»*

Paul Verlaine

1 BRITISH ASSOCIATION OF PSYCHONEUROPHARMACOLOGY

Summer Meeting 2011

Chronic psychosocial stress in tree shrews induces lateralized cytoskeletal and synaptic changes in hippocampus and prefrontal cortex

L. Paresys^{1,2}, N. Ladurelle^{1,2}, E. Fuchs³, E. E. Baulieu^{1,2}, M. Bianchi¹

¹MAPREG, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-UMR788, Neuroprotection and Neuroregeneration, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center, Gottingen, Germany

Psychosocial stress in tree shrews (*Tupaia belangeri*) is an established animal model of depressive disorders inducing neuronal and glial structural changes in specific brain regions. (Fuchs *et al.*, 2005, *Physiol Behav.* 73:285-291). Recent data indicate that depression is associated to brain structural changes which have been reported of different magnitude between the right and left hemisphere. Growing evidence in animal models suggest that cytoskeletal microtubule dynamics may play a role on such structural alterations (Bianchi *et al.*, 2009, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19:778-90). Here, we investigated the effects of psychosocial stress in tree shrews on the expression of microtubule dynamics markers and synaptic markers, in the right and left hippocampus and prefrontal cortex (PFC).

Adult male tree shrews (n=6) were submitted to four weeks of psychosocial stress or non-stressed (n=6), as previously described (Fuchs *et al.*, 2005, *Physiol Behav.* 73:285-291). Urinary cortisol was monitored using commercially available kits. At the end of the study, the hippocampus and PFC were dissected and processed for Western blot analysis of microtubule dynamics markers (Tyr/Glu-Tub, Acet-Tub and Delta2-Tub), pre-synaptic (synaptophysin) and post-synaptic (PSD-95) markers. Total alpha-tubulin was used as house-keeping protein. The ANOVA or t-test was used as statistical analysis. Results are expressed as mean±SEM in % of non-stressed animals.

Tree shrews exposed to psychosocial stress showed decrease of body weight (93±2%, p<0.05), and increase in urinary cortisol (207±17%, p<0.01), confirming the stressful conditions of the animals. In the right hippocampus Tyr/Glu-Tub ratio decreased to 73±7% (P<0.05) and PSD-95 increased to 153±16% (P<0.05), suggesting decreased microtubule dynamics and post-synaptic remodelling. In contrast, the left hippocampus showed no changes. Moreover, in the right PFC Tyr/Glu-Tub ratio (156±9%; P<0.05), the neuron-specific Delta2-Tub (125±3%; P<0.05) and PSD-95 (120±5%; P<0.01) increased indicative of enhanced neuronal microtubule dynamics and post-synaptic remodelling. In contrast, the left PFC showed a decrease (p<0.05) in Tyr/Glu-Tub ratio (79±5%) and Delta2-Tub (82±3%), suggesting reduced microtubule dynamics; this effect was accompanied by decreased synaptophysin (83±2%; P<0.05) consistent with pre-synaptic alterations.

The main results of the study show cytoskeletal and synaptic changes in the hippocampus and PFC with differences between the right and left hemisphere in response to psychosocial stress in tree shrews. In particular, the right hippocampus appears to be more vulnerable than the left one. Opposite responses were detected in the right and left PFC. These findings further support the possible involvement of neuronal microtubules in depressive disorders.

Summer Meeting 2012

Further evidence on the antidepressant efficacy of 3beta-methoxy-pregnenolone (MAP4343) in experimental models: effects in tree shrews (*Tupaia belangeri*) exposed to chronic psychosocial stress

Lucie Paresys¹, Kerstin Hoffmann², Simon Bate³, Etienne Emile Baulieu¹, Eberhard Fuchs², Massimiliano Bianchi¹

¹MAPREG psychopharmacology, Le Kremlin-Bicêtre, France ; ²Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center, Gottingen, Germany; ³Huntingdon Life Sciences, Huntingdon, England

MAP4343 (3beta-methoxy-pregnenolone) has antidepressant efficacy in rats isolated from weaning (Bianchi and Baulieu, 2012, PNAS 109:1713-8). MAP4343 specifically binds the microtubule associated protein-2 (MAP2) and modulates brain microtubule function. The antidepressant efficacy of MAP4343 is here investigated in the chronic psychosocial stress model in tree shrews. Tree shrews are small day-active mammals, closely related to primates and with important translational relevance for stress research (Fuchs, 2005, CNS Spectr. 10: 182-189). Bodyweight, urinary cortisol, noradrenaline and testosterone levels were investigated. The expression of markers of microtubule dynamics, MAP2 and synaptic markers was also detected in the prefrontal cortex (PFC).

Adult male tree shrews (n=16) were submitted to eight weeks of an established experimental protocol consisting of two first weeks of undisturbed conditions (control weeks) followed by six weeks of psychosocial stress. During the two first weeks of stress (stress weeks) the animals received daily *per os* administration of the vehicle while during the four following weeks (treatments weeks) received daily *per os* administration of either MAP4343 (50mg/kg, n=8) or the vehicle (n=8). Urine was collected daily and cortisol, noradrenaline and testosterone were quantified. PFC was dissected 24h after the last drug / vehicle administration and processed for Western blot of microtubule dynamics markers, phosphoMAP2/MAP2, pre-synaptic (synaptophysin) and post-synaptic (PSD-95) markers. Total alpha-tubulin was used as housekeeper. Hormones, bodyweight and molecular data were analysed using a repeated measures mixed model analysis approach, followed by pre-planned comparisons to compare treatments. Results are expressed as mean±SEM.

Bodyweight and testosterone were decreased by stress and MAP4343 was ineffective in counteracting these stress-induced responses. However, MAP4343 blocked the stress-induced increase in noradrenaline compared to vehicle (p<0.01) and had a similar tendency on the stress-induced cortisol increase, but the latter was not significant. In the PFC, MAP4343 has no effects on microtubule dynamics markers. PhosphoMAP2/MAP2 was increased by

MAP4343 in the right PFC (1.08 ± 0.05 , $p < 0.01$) and decreased in the left PFC (0.97 ± 0.09 , $p < 0.05$) compared to vehicle. This was accompanied by decreased synaptophysin (0.95 ± 0.07 , $p < 0.05$) and increased PSD95 (1.09 ± 0.09) in the right PFC compared to vehicle, while increased synaptophysin (1.09 ± 0.07 , $p < 0.01$) was detected in the left PFC.

Our results show that MAP4343 appears to block the increase in hormonal levels related to stress response. These effects were accompanied by differential changes in phosphoMAP2/MAP2 and synaptic proteins in the right and left PFC suggestive of modulation of microtubule function and synaptic remodelling.

2 EUROPEAN CONGRET OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY

Psychosocial Stress in tree shrews induces hormonal alterations accompanied by lateralized cytoskeletal changes in the hippocampus.

L. Paresys^{1,2}, E. Fuchs³, E. E. Baulieu^{1,2}, M. Bianchi¹

¹MAPREG, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-UMR788, Neuroprotection and Neuroregeneration, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³German Primate Center, Gottingen, Germany.

Introduction: Chronic psychosocial stress in tree shrews (*Tupaia belangeri*) is an established model of depressive disorders resembling most symptoms observed in human patients [1]. Stressed tree shrews showed decreased body weight and increased urinary cortisol paralleled by neuronal and glial structural alterations in the hippocampus [2]. Recent data indicate that the pathogenesis of depressive disorders may be associated to structural changes in the hippocampus which have been reported of different magnitude between the right and left hemisphere. Growing evidence in rats suggests a link between the hippocampal structural alterations observed in depression and changes in the dynamics of the neuronal cytoskeletal microtubules [3]. The present study investigated the effects of psychosocial stress in tree shrews on markers of microtubule dynamics and synaptic markers in the left and right hippocampus. The body and testicular weight, as well as the urinary cortisol, noradrenaline and testosterone concentrations, were also monitored to validate the model.

Methods: Adult male tree shrews were submitted to four weeks of psychosocial stress ($n=6$) or kept undisturbed in their home cages (control; $n=6$), as previously described [1]. Urinary cortisol, noradrenaline and testosterone were monitored throughout the study using commercially available kits. Testes and hippocampi were dissected at the end of the study. The left and right hippocampi were processed for the western blot analyses of markers of microtubule dynamics (Tyr/Glu-Tub, Acet-Tub and Delta2-Tub), synaptic markers (synaptophysin, PSD-95), and of the dendrites-specific microtubule associated protein type-2 (MAP2). Total alpha-tubulin was used as house-keeper proteins. The ANOVA or t-test was used as appropriate statistical analysis.

Results: Stressed tree shrews showed a significative decrease of body weight (93 ± 2 % of control, $p < 0.05$), and a significative increase ($p < 0.01$) in urinary cortisol ($207 \pm 17\%$ of control) and urinary noradrenaline ($237 \pm 12\%$ of control). Additionally, the urinary

concentration of testosterone was also significantly decreased (68 ± 7 % of control, $p < 0.05$) as well as the testes weight (75 ± 4 % of control, $p < 0.01$). Such physiological and hormonal alterations validate the stressful conditions of the animals. Furthermore, in the right hippocampus Tyr/Glu-Tub was significantly decreased (73 ± 7 % of control; $p < 0.05$) suggesting decreased microtubule dynamics; furthermore, the post-synaptic marker PSD-95 was significantly increased (153 ± 16 % of control; $p < 0.05$) indicative of dendritic remodelling phenomena; the pre-synaptic markers synaptophysin and MAP2 were unchanged. In contrast, in the left hippocampus a significant increase in MAP2 (120 ± 3 % of control; $p < 0.05$) was detected suggesting microtubule changes in neuronal dendrites; all the other analysed molecular markers were unchanged.

Conclusion: The present physiological and hormonal data confirm the psychosocial stress in tree shrews as an interesting model of depression. Such alterations are accompanied by different molecular changes in the right and left hippocampus. Thus, the right hippocampus appears to be more vulnerable and shows modifications indicative of microtubule stabilization and post-synaptic reorganization. On the other hand, the left hippocampus shows specific changes in the composition of dendritic microtubules reflecting possible functional cytoskeletal alterations. These data further support the hypothesis of an involvement of neuronal microtubules in depressive disorders.

[1] Fuchs, E., 2001 Social Stress in Tree Shrews as an Animal Model of Depression: An Example of a Behavioral Model of a CNS Disorder. *CNS Spectr.* 10:182-190.

[2] Fuchs, E., Flügge, G., Ohl, F., Lucassen, P., Vollmann-Honsdorf, G. K., Michaelis, T., 2005 Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. *Physiol Behav.* 73:285-291.

[3] Bianchi, M., Fone, K. C., Shah, A. J., Atkins, A. R., Dawson, L. A., Heidbreder, C. A. , Hagan, J. J., Marsden, C. A., 2009 Chronic fluoxetine differentially modulates the hippocampal microtubular and serotonergic system in grouped and isolation reared rats. *ENP* 19:778-790.

RÉSUMÉ

Les troubles dépressifs constituent un problème majeur de santé publique puisqu'ils affectent plus de 350 millions de personnes dans le monde. La plupart des médicaments antidépresseurs prescrits actuellement ciblent les systèmes monaminergiques centraux. Cependant, ces molécules ont un délai d'action de plusieurs semaines et produisent des effets secondaires substantiels, souvent responsable de l'arrêt du traitement. De plus, un pourcentage non négligeable de patients ne répond que partiellement ou négativement à ces traitements. C'est pourquoi le développement de nouvelles molécules antidépressives constitue un axe majeur de recherche en psychopharmacologie. Le 3 β -méthoxy-prégnénolone (MAP4343), un névrotéroïde de synthèse, constitue une nouvelle molécule dont l'efficacité antidépressive a été récemment établie dans un modèle d'isolement social chez le rat. Le mode d'action du MAP4343 serait différent de celui des antidépresseurs conventionnels, puisqu'il a été montré *in vitro* qu'il pouvait se lier à la protéine associée aux microtubules de type 2 (MAP2) pour ainsi modifier la fonction microtubulaire, ce qui, *in fine*, favoriserait la plasticité cérébrale.

L'objectif de cette thèse est de consolider les preuves de l'efficacité antidépressive du MAP4343 et d'élucider les mécanismes d'action cellulaires associés à son effet pharmacologique. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles animaux de dépression issus de deux espèces différentes: (i) le Toupaye de Belanger (*tupaia belangeri*) soumis au stress psychosocial chronique qui développe des troubles comportementaux, fonctionnels et hormonaux similaires à ceux observés chez les patients dépressifs et (ii) la lignée de rat Wistar Kyoto (WKY), un modèle spontanée montrant un comportement de type anxiodepressif.

Chez le Toupaye, l'administration chronique de MAP4343 (50 mg/kg/jour ; *per os*) pendant quatre semaines permet d'inhiber la diminution de l'activité locomotrice et le comportement d'évitement induit par le stress. De plus, les altérations physiologiques comme la diminution du poids corporel, l'hyperthermie ou encore les troubles du sommeil sont enrayés par le traitement au MAP4343. Enfin, la molécule agit en inhibant partiellement l'hyperactivation de l'axe adreno-corticotrope. Les rats WKY traités par une injection quotidienne de MAP4343 (10 mg/kg/jour, s.c.) pendant 4 jours, montrent eux une augmentation de leur l'activité locomotrice, associée à une réduction de leur comportement anxieux mesuré dans « l'open-field ». Enfin l'administration de MAP4343 réduit significativement leur immobilité lors du test de nage forcée. Les mesures dans l'hippocampe de l'expression des isoformes de l' α -tubuline, élément constitutif des microtubules, montrent dans les deux modèles, une diminution de l' α -tubuline tyrosinée, une isoforme plus abondante dans des microtubules néoformés. Ce phénomène n'est pas renversé par le MAP4343. Cependant, chez le Toupaye, le stress chronique induit une réduction de l'expression de la forme acétylée de l' α -tubuline, un phénomène qui serait plus tardif lors d'une altération de la fonction microtubulaire. De façon intéressante, le MAP4343 permet de prévenir cette baisse de l'acétylation.

Ce travail de thèse démontre un effet antidépresseur robuste du MAP4343, reproductible dans deux modèles animaux de dépression, chez deux espèces différentes, confirmant ainsi une première étude réalisée auparavant. Son efficacité est observée dès les premiers jours de traitement chez le rat et peut se maintenir lors d'un traitement prolongé comme chez le Toupaye. Cette molécule constituerait ainsi une nouvelle classe d'antidépresseurs ayant comme cible potentielle le système microtubulaires. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin de préciser le mode d'action du MAP4343 sur les fonctions neuronales.

Sommaire

I. INTRODUCTION	15
I.1. TROUBLES DÉPRESSIFS	15
I.1.1. Définition (American Psychiatric Association, 2000)	15
I.1.1.1. Troubles dépressifs	15
I.1.1.2. Dépression majeure : diagnostic	16
I.1.1.3. Description des symptômes	17
I.1.1.4. Étude des altérations du sommeil	20
I.1.2. Épidémiologie	22
I.1.2.1. Prévalence : une maladie mondiale	22
I.1.2.2. Facteurs génétiques	24
I.1.2.3. Facteurs environnementaux et épigénétiques	25
I.1.3. Éléments de physiopathologie	27
I.1.3.1. Implication des systèmes monoaminergiques centraux	28
I.1.3.2. Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	31
I.1.3.3. Plasticité cérébrale	33
I.1.3.4. Hypothèse glutamatergique	37
I.2. THÉRAPEUTIQUE ANTIDÉPRESSIVE	37
I.2.1. Classification	38
I.2.1.1. Inhibiteurs des monoamine oxydases	38
I.2.1.2. Tricycliques	39
I.2.1.3. Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)	40
I.2.1.4. Antidépresseurs atypiques	41
I.2.2. Limites des antidépresseurs conventionnels	42
I.2.2.1. Délai d'action des ISRS	42
I.2.2.2. Efficacité	43
I.2.2.3. Effets secondaires	44
I.2.3. Nouvelles voies thérapeutiques	45
I.2.3.1. Action sur les systèmes monoaminergiques	45
I.2.3.2. Action sur le système glutamatergique	47
I.2.3.3. Neuropeptides	48

I.3. IMPLICATIONS DES MICROTUBULES DANS LA DÉPRESSION	48
I.3.1. Les microtubules, élément dynamique du cytosquelette	49
I.3.1.1. Nature et fonction des microtubules	49
I.3.1.2. MAP2, protéine structurale associée aux microtubules	52
I.3.1.3. Modifications post-traductionnelles de la tubuline α	53
I.3.2. Modifications post-traductionnelles et dynamique des microtubules	55
I.3.3. Microtubules dans le système nerveux central	56
I.3.4. Implication de la dynamique microtubulaire dans la physiopathologie de la dépression	57
I.4. MODÈLES ANIMAUX DE DÉPRESSION	59
I.4.1. Modèles animaux des troubles dépressifs	59
I.4.2. Stress psychosocial chronique chez le toupaye de Belanger	60
I.4.2.1. Toupaye de Belanger	60
I.4.2.2. Le stress psychosocial chronique chez le toupaye - un modèle de dépression	61
I.4.3. Lignée de rats Wistar Kyoto	63
I.5. NEUROSTÉROÏDES : DÉFINITION ET MODE D'ACTION	64
I.5.1. Neurostéroïdes	64
I.5.2. Neurostéroïdes et troubles dépressifs	66
I.5.3. Le MAP4343	67
I.6. OBJECTIFS	69

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	72
II.1. ANIMAUX	72
II.1.1. Toupayes de Belanger (<i>Tupaia belangeri</i>)	72
II.1.2. Rats Wistar Kyoto	72
II.2. PRÉPARATION ET ADMINISTRATION DU MAP4343	73
II.2.1. Administration orale pour le toupaye de Belanger	73
II.2.2. Administration sous-cutanée des rats Wistar et Wistar Kyoto	73
II.3. DOSAGE DE MAP4343 DANS LE PLASMA DES TOUPAYES	73
II.4. MODÈLE DE STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE	74
II.4.1. Protocole expérimental	74
II.4.2. Mesures comportementales	78
II.4.2.1. Activité locomotrice	78
II.4.2.2. Comportement d'évitement	78
II.4.3. Mesure du taux d'hormones urinaires	78
II.4.4. Mesure de la température corporelle et enregistrement de l'électroencéphalogramme	79
II.5. MODÈLE SPONTANÉ, LE WISTAR KYOTO	80
II.5.1. Protocole expérimental	80
II.5.2. Tests de comportement	81
II.5.2.1. Activité locomotrice (LMA) et anxiété dans « l'open field »	81
II.5.2.2. Labyrinthe en croix surélevé (EPM)	81
II.5.2.3. Test de nage forcée (FST)	82
II.6. DÉTECTION INFRAROUGE DE PROTÉINES MICROTUBULAIRES HIPPOCAMPIQUES PAR WESTERN BLOT	82
II.7. ANALYSE STATISTIQUE	84

III. RÉSULTATS	85
III.1. EFFICACITÉ ANTIDÉPRESSIVE DE LA 3B-MÉTHOXY-PRÉGNÉNONE (MAP4343) CHEZ LE TOUPAYE EXPOSÉ AU STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE, UN MODÈLE DE TROUBLES DÉPRESSIFS PROCHE DU PRIMATE	85
III.1.1. Synthèse des résultats de l'article soumis	85
III.1.1.1. Concentration plasmatique du MAP4343 et effets du MAP4343 sur le poids	85
III.1.1.2. Effet du MAP4343 sur le comportement associé au stress psychosocial chronique	85
III.1.1.3. Effet du MAP4343 sur les hormones urinaires	86
III.1.1.4. Effet du MAP4343 sur l'hyperthermie induite par le stress.....	87
III.1.1.5. Effet du MAP4343 sur les altérations du sommeil induites par le stress.....	87
III.1.1.6. Étude du système microtubulaire hippocampique	88
III.1.2. Article	89
III.2. EFFET DE L'ADMINISTRATION AIGUË DE MAP4343 DANS UN MODÈLE DE TROUBLES DÉPRESSIFS INNES, LE RAT WISTAR KYOTO	128
III.2.1. Poids corporel	128
III.2.2. Comportement	130
III.2.2.1. Activité locomotrice	130
III.2.2.2. Comportement de type « Anxieux »	131
III.2.2.3. État de type « dépressif » évalué dans le test de la nage forcée (FST)	133
III.2.3. Analyse du système microtubulaire de l'hippocampe par Western Blot.....	133
IV. DISCUSSION	136
IV.1. EFFET DU STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE SUR LE COMPORTEMENT ET LA PHYSIOLOGIE CHEZ LE TOUPAYE DE BELANGER	136
IV.2. EFFET ANTIDÉPRESSEUR DU MAP4343 SUR LE STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE CHEZ LE TOUPAYE DE BELANGER	139
IV.3. COMPORTEMENT ANXIO-DÉPRESSIF DE LA LIGNÉE DE RATS WISTAR KYOTO	141
IV.4. EFFET ANTIDÉPRESSEUR DU MAP4343 SUR LA LIGNÉE DE RAT WISTAR KYOTO	142

IV.5. MODULATION DU SYSTÈME MICROTUBULAIRE DE L'HIPPOCAMPE DANS LES DEUX MODÈLES DE DÉPRESSION	144
IV.6. EFFET DU MAP4343 SUR LE SYSTÈME MICROTUBULAIRE HIPPOCAMPIQUE DANS LES DEUX MODÈLES UTILISÉS	145
V. CONCLUSION	147
VI. ABRÉVIATIONS	148
VII. RÉFÉRENCES	151

Le DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IVth édition*) rédigé par l'association américaine de psychiatrie (*American psychiatric association, APA*) classifie les différents troubles psychiques dont les troubles de l'humeur. Ce manuel a pour but d'établir des diagnostics spécifiques en se basant sur des critères symptomatiques, donc descriptifs. Il définit quatre catégories de troubles de l'humeur : les troubles dépressifs (unipolaires), les troubles bipolaires, les troubles de l'humeur dus à l'état de santé général et les troubles de l'humeur dus à la prise de substances.

Les troubles unipolaires se distinguent des troubles bipolaires par l'absence totale d'épisodes maniaques, hypomaniaques ou mixtes (maniaques avec au moins deux symptômes de dépression). Ils sont divisés en trois types : le trouble dépressif majeur, le trouble dysthymique et les troubles dépressifs non spécifiés. Le trouble dysthymique se différencie principalement par la durée de l'humeur dépressive qui doit être de deux ans au minimum au lieu de deux semaines pour la dépression majeure. En revanche, la gravité minimale des symptômes est moindre pour le trouble dysthymique.

I.1.1.2. Dépression majeure : diagnostic

Dans la mesure où, jusqu'à présent, aucun marqueur biologique de la dépression n'a pu être validé, le diagnostic de dépression majeure est intégralement établi sur la base d'un interrogatoire oral. Par conséquent, cette pathologie ne peut être décrite que dans l'espèce humaine. Cependant, certains comportements et certaines modifications physiologiques associés aux troubles dépressifs peuvent être reproduits expérimentalement chez l'animal de laboratoire, ce qui permet de disposer de modèles animaux (*voir paragraphe I.1.3*).

Le trouble dépressif majeur est caractérisé par la présence d'un ou plusieurs épisodes dépressifs majeurs. L'épisode dépressif majeur est défini par la présence d'un minimum de symptômes décrits ci-dessous. En premier lieu, la personne doit présenter au moins 1) la

manifestation d'une humeur dépressive et/ou 2) l'expression d'une perte d'intérêt ou de plaisir (anhédonie). D'autre part, elle doit aussi souffrir d'au moins trois des sept symptômes suivants :

- Trouble de l'appétit avec perte ou gain de poids
- Trouble du sommeil (insomnie ou hypersomnie)
- Agitation ou ralentissement psychomoteur
- Fatigue ou perte d'énergie
- Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée
- Difficultés de concentration, de mémoire et/ou de prise de décision
- Idées suicidaires récurrentes

Ces caractères doivent être nouveaux chez l'individu ou sévèrement aggravés par rapport à la période précédant l'épisode dépressif. Ils doivent être présents presque toute la journée, tous les jours et persister durant au moins deux semaines. Chaque épisode, s'il y en a plusieurs, doit être séparé du précédent par une période d'au moins deux mois.

L'épisode dépressif doit engendrer une détresse clinique et/ou un dysfonctionnement dans les relations sociales. L'individu doit être dans l'incapacité de mener une vie normale, telle qu'elle se déroulait avant ledit épisode, et cela doit se ressentir dans au moins un domaine de sa vie (vie professionnelles, vie de couple, vie de famille). Les troubles dépressifs peuvent aller jusqu'à provoquer un licenciement, un divorce ou bien, dans le pire des cas, le suicide de l'individu.

I.1.1.3. Description des symptômes

Le diagnostic étant lié à l'interrogatoire du patient, la caractérisation des symptômes d'un état dépressif peut s'avérer très difficile. L'humeur dépressive n'est pas toujours exprimée oralement, mais peut se révéler à travers le faciès et l'apparence du patient (Keefe 1995).

De récentes études ont montré que les antidépresseurs sont capables de modifier précocement les expressions faciales ainsi que les performances cognitives chez le volontaire sain (Di Simplicio et al. 2014).

La perte d'intérêt se détecte souvent par une diminution de la pratique d'activités qui auparavant apportaient du plaisir. Il peut être également observé une baisse de la libido. Les modifications de l'appétit se traduisent le plus souvent par une réduction de la prise de nourriture. Cependant, un phénomène inverse peut être observé avec le désir d'aliments particulièrement sucrés. À un stade sévère, cette appétence pour les sucreries peut modifier significativement le poids.

Les perturbations du sommeil les plus fréquemment observées lors d'un épisode dépressif majeur sont des insomnies légères (réveil au milieu de la nuit) et terminales (réveil trop tôt). Cependant certains patients parlent également de difficultés à s'endormir en début de nuit et plus rarement d'hypersomnie. Ces symptômes sont parfois la seule cause de demande de médication de la part du patient. Des enregistrements de l'électroencéphalogramme (EEG) ont montré la présence des troubles du sommeil chez 40 à 60 % des patients dépressifs et chez 90% des individus pendant un épisode dépressif majeur (American Psychiatric Association 2000).

L'activité psychomotrice peut être augmentée (impossibilité de rester assis, marche rapide, frottement des mains, de la peau, des vêtements, etc.) ou diminuée (élocution lente, mouvement ralenti, etc.) mais, dans tous les cas, les variations doivent être assez prononcées pour être détectables par un tiers. La diminution de l'énergie est exprimée lors de la réalisation d'une action normalement peu coûteuse pour l'individu, par une fatigue particulièrement importante et une perte d'efficacité. Cela se traduit par le sentiment que la moindre tâche demande un certain effort.

Le sentiment de dévalorisation et de culpabilité est extrêmement courant lors d'un épisode dépressif. Il est souvent exprimé par l'individu comme un sentiment de médiocrité ou de culpabilité lors d'événements qui ne sont pas de sa responsabilité et qui, en réalité, le dépassent. Ce symptôme irrationnel est très courant et peut prendre des proportions considérables.

La perte de concentration, le déficit de mémoire et le manque de prise de décision s'expriment par le fait que le patient se plaint d'être vite distrait, d'avoir des pertes de mémoire ou de ne plus pouvoir réaliser des tâches compliquées qui étaient auparavant réalisables. Chez les personnes âgées, ce symptôme peut être confondu avec l'expression d'une démence.

Enfin, concernant les idées de suicide, dans les cas les moins sévères l'individu y pense une à deux fois par semaine, quelques minutes au plus. En revanche, au stade le plus alarmant l'individu a planifié son suicide (heure, lieu, obtention du matériel).

La difficulté pour définir cette maladie réside dans la complexité, l'hétérogénéité et l'expression variée de ses symptômes. En effet, un épisode dépressif majeur peut être confondu avec un épisode mixte ou bien avec une partie d'une autre pathologie engendrant des symptômes associés à la dépression. Non seulement tous les patients n'expriment pas l'ensemble des symptômes, mais ils peuvent coexister à des intensités très variables. Il existe plusieurs échelles de diagnostic conçues dans le but d'appréhender objectivement la gravité de la pathologie. La plus utilisée est l'échelle de Hamilton (Hamilton 1960; Hamilton 1967). Cette échelle requiert une valeur donnée par le praticien à chaque symptôme s'exprimant chez son patient. Elle engendre une note globale qui permet de suivre l'évolution de la maladie.

I.1.1.4. Étude des altérations du sommeil

Des études réalisées à l'aide d'électroencéphalogramme chez des patients atteints de troubles dépressifs ont permis de comprendre quelles étaient les altérations du sommeil impliquées dans la pathologie. La méthode de l'électroencéphalogramme consiste à placer des électrodes sur le crâne de l'individu et à mesurer l'activité électrique générale de son encéphale. L'activité électrique oscille à différentes fréquences et intensités. Des types d'ondes ont été identifiés en fonction de la fréquence et de l'intensité (voir Figure I.1). À l'éveil, succède une phase de sommeil léger de type NREM pour « *non Rapid Eye Movement* ». On peut en observer quatre stades constitués d'ondes de plus en plus lentes, amples et intenses. Les deux derniers stades (stades 3 et 4, voir Figure I.1), constituent le sommeil à onde lente ou sommeil profond. Il s'agit d'une sorte de synchronisation et de ralentissement général de l'activité cérébrale. Puis survient le sommeil paradoxal ou REM pour « *Rapid Eye Movement* ». Les ondes détectées ressemblent à celles observées pendant la veille, c'est-à-dire qu'elles sont faibles et rapides. Cependant, aucune activité physique n'est détectée durant cette phase, hormis une activité rapide des yeux et de l'oreille interne. Ce sommeil est connu pour son implication dans le développement du système nerveux et dans les processus cognitifs en général, comme la mémorisation (Pilcher and Huffcutt 1996; Jackson et al. 2013). La succession du NREM et du REM constitue un cycle de sommeil et dure en environ 90 min (voir Figure I.1.). Cinq cycles, en moyenne, se succèdent durant la nuit d'un individu.

C'est Snyder en 1972, à l'Institut national de la santé mentale (NIMH) aux États-Unis, ainsi que David J. Kupfer, cette même année, qui s'intéressent aux EEG des patients déprimés dans le but de trouver des marqueurs spécifiques des troubles dépressifs. Outre une diminution de la latence du premier sommeil REM chez les patients atteints de troubles affectifs (D J Kupfer

and Foster 1972), il a été montré, par la suite, une augmentation de la durée de la première phase de sommeil REM et de la densité du REM (Arfken et al. 2014).

Ceci constitue, encore aujourd'hui, un trouble important lors d'un épisode dépressif majeur (Kupfer, 1995; Kupfer and Ehlers, 1989; Steiger *et al.*, 2013). Il a également été montré une réduction du sommeil NREM en particulier de la durée du stade 2, mais de façon plus légère, en début de nuit et une discontinuité du sommeil (David J. Kupfer 1995). Ces phénomènes ne sont pas spécifiques de la dépression, mais se retrouvent dans de nombreuses pathologies psychiatriques (Benca *et al.*, 1992).

La relation entre sommeil et troubles dépressifs est telle qu'il a été établi qu'une privation de sommeil pouvait avoir un effet antidépresseur, en stimulant l'activité sérotoninergique (Adrien 2002). De plus, les troubles du sommeil pourraient être des marqueurs de maladies psychiatriques (Arfken et al. 2014).

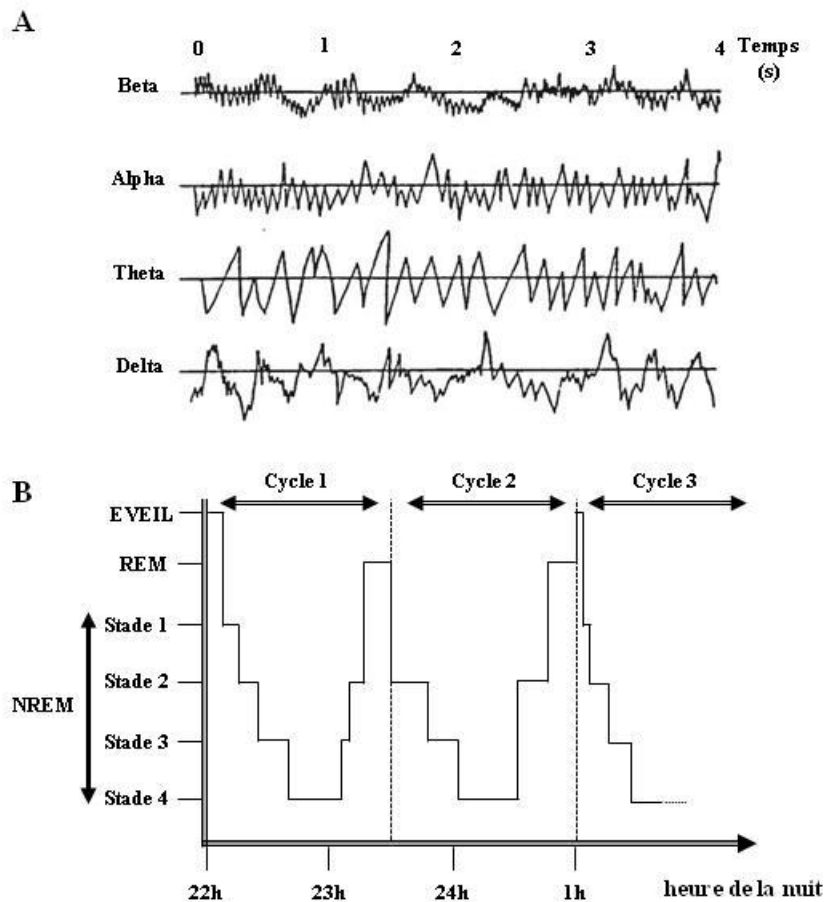


Figure I.1 : Ondes cérébrales observées par électro-encéphalogramme et hypnogramme (inspiré des schémas du Réseau Morphée)

(A) *Electro-encéphalogramme* : les quatre types d'ondes cérébrales (bêta, alpha, thêta et delta) ; intensité du courant en fonction du temps (en secondes).

(B) *Hypnogramme* : schéma des cycles du sommeil en fonction du temps (en heures); REM : « rapid eye movement », NREM : « non - rapid eye movement », Stade 1, 2, 3, 4 : Stade du sommeil NREM.

I.1.2. Épidémiologie

I.1.2.1. Prévalence : une maladie mondiale

« Une bonne santé mentale permet aux individus de se réaliser, de surmonter les tensions normales de la vie, d'accomplir un travail productif et de contribuer à la vie de leur communauté » (Constitution de l'Organisation mondiale de la santé, OMS). La dépression

représente à elle seule 4,3 % de la charge mondiale de morbidité et est l'une des principales causes d'incapacité (11 % des années de vie vécues avec une incapacité dans l'ensemble du monde) en particulier chez les femmes (Organisation Mondiale de la Santé 2014). Le nombre de décès par suicide est estimé à 1 million par an (Organisation Mondiale de la Santé 2014).

Les conséquences économiques sont également très importantes, mais il est difficile d'évaluer celles qui sont dues uniquement à la dépression. Selon une étude récente, on estime que l'impact mondial cumulé des troubles mentaux en termes de perte de production économique représentera 16 300 millions de millions de dollars entre 2011 et 2030 (Organisation Mondiale de la Santé 2012). En effet, la charge de la dépression et des autres pathologies mentales serait en augmentation dans le monde.

La prévalence vie entière est deux fois plus importante chez les femmes que chez les hommes à partir de l'adolescence et ce, quelle que soit la localisation géographique et le contexte socio-culturel (American Psychiatric Association 2000). Le sexe est le facteur de corrélation le plus fréquent (Van de Velde, Bracke, and Levecque 2010). La prévalence vie entière varie de 10 à 25 % pour les femmes et de 5 à 12 % pour les hommes (American Psychiatric Association 2000). En revanche, chez les enfants, on n'observe pas de différence entre sexes (American Psychiatric Association 2000).

Par ailleurs, il a été observé des différences entre pays de la prévalence de la pathologie. Elle varie de 1,5% à Taiwan à 19% à Beyrouth entièrement détruit par la guerre (Weissman et al. 1996). De même, l'expression des symptômes peut varier selon la localisation géographique. Par exemple la somatisation de la maladie, telle que les troubles gastro-intestinaux, sera plus exprimée dans certains pays d'Asie du sud-est (Hsu, Davies, and Hansen 2004). La situation sociale influence également la prévalence de la pathologie (Bromet et al. 2011). Le fait d'être divorcé (ou séparé) serait ainsi un facteur prépondérant (Weissman et al. 1996).

La dépression majeure peut survenir à tout âge. La moyenne d'âge d'un premier épisode dépressif est d'environ 25 ans (Bromet et al. 2011). De plus, la prépondérance de certains traits variera également avec l'âge (Andrade et al. 2003; Bromet et al. 2011). On peut noter, par exemple, que chez l'enfant et l'adolescent l'humeur dépressive, plutôt présente chez l'adulte, est généralement supplantée par une irritabilité. Il est à noter également qu'au delà de 55 ans, la pathologie multiplie le taux de décès par quatre (DSM IV, 2000).

I.1.2.2. Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques ne sont pas négligeables. Des études sur des vrais jumeaux ont permis d'établir que le facteur génétique correspondait à 39% des facteurs de risque de dépression majeure (Kendler and Prescott 1999) et que ce facteur était globalement le même pour les deux sexes.

Cependant, aucun gène n'a encore été reconnu jusqu'ici comme responsable, même si certaines études ont montré des corrélations entre génétique et troubles dépressifs. En effet, en 2007, une étude conclut un lien entre l'âge de l'apparition de la maladie et un polymorphisme identifié au niveau du locus 15q25-q26 du chromosome 15 (Holmans et al. 2007). De plus, une prédisposition à la dépression a été associée au polymorphisme, *serotonin-transporter-linked polymorphic* (5-HTTLPR), qui affecte le promoteur et donc la transcription du gène du transporteur de la sérotonine (5-HTT ou SERT) (Lotrich and Pollock 2004). Une étude complémentaire a attribué à un allèle du 5-HTTLPR une réduction du volume de la matière grise observée dans l'amygdale par imagerie fonctionnelle (Pezawas et al. 2005). Une relation directe entre ce polymorphisme et la survenue de troubles dépressifs n'a cependant pas pu être établie. Toutefois, s'il est associé à un événement stressant, ce polymorphisme a été corrélé avec une prévalence accrue d'apparition de troubles dépressifs (Caspi et al. 2003).

I.1.2.3.1. Événement stressant : facteur environnemental majeur

Au cours de la vie de l'individu, des événements stressants importants peuvent survenir. Leur apparition a été corrélée avec celle de troubles dépressifs majeurs dans de nombreuses études (Kendler et al., 1999). Ces événements correspondent, par exemple, à une agression physique, une séparation ou la perte d'un proche. Cependant, il a été aussi montré que des événements positifs tels qu'un mariage pouvaient être des facteurs de stress associés au déclenchement de la pathologie (Kendler, Karkowski, and Prescott 1999). Thomas Holmes et Richard Rahe créent en 1967 une échelle de notation des événements de vie stressants pouvant être associés à des troubles psychiatriques liés au stress (*The Social Readjustment Rating Scale*, SRRS) (Holmes and Rahe 1967). Cette échelle donne une valeur qui correspond à un degré relatif de stress pour chaque événement de vie. Par exemple, un mariage est noté 50, un changement de résidence est noté 20 et le décès du conjoint 100. Cependant, dans la pratique, la valeur de chaque événement est variable en fonction de la sensibilité de l'individu au stress. Cela a été également montré chez l'animal (Bale 2006; M. V. Schmidt et al. 2010). Ainsi, il existe des individus plus résistants que d'autres aux événements stressants et ceci serait lié à leur patrimoine génétique (Kendler, Karkowski, and Prescott 1999).

Considérant l'importance du stress dans la survenue des troubles de l'humeur, l'exposition à divers stress chronique d'animaux de différentes espèces est proposée depuis plusieurs décennies comme modèle expérimental de dépression (Willner and Mitchell 2002; Eberhard Fuchs 2005). Ces animaux soumis à une succession d'événements stressants, ou « *stressors* », reproduisent des comportements de type « anxieux » et/ou « dépressifs » qui peuvent être comparés à ceux observés chez l'homme. On observe ainsi chez ces animaux des altérations physiologiques telles que, par exemple, une hyper-cortisolémie également observée chez

certain patients déprimés (Carroll et al. 2007) (voir paragraphe I.1.3.3). Ainsi, le stress serait un facteur déclenchant les troubles dépressifs, mais la vulnérabilité héréditaire de l'individu contribuerait aussi à l'expression de cette pathologie.

I.1.2.3.2. Facteurs épigénétiques

La réaction propre d'un individu à un stress dépend de l'interaction entre son patrimoine génétique et son environnement. En effet, des facteurs environnementaux engendrent un certain nombre de modifications dites épigénétiques au niveau cellulaire. Deux principaux phénomènes cellulaires caractérisant ces modifications épigénétiques ont été récemment mis à jour : la méthylation de l'ADN sur des cystéines (Booij et al. 2013; Elliott et al. 2010; Essex et al. 2013; Keller S et al. 2010; Klengel et al. 2014) et les modifications post-traductionnelles des protéines associées à la structure de la chromatine, les histones par exemple (Tsankova, Kumar, and Nestler 2004; Tsankova et al. 2006). Ces modifications engendrent des changements de l'accessibilité à l'ADN par la machinerie de transcription et donc une modification dans la régulation de l'expression des gènes. De plus, des ARN non codants (ncRNA) peuvent également influencer l'expression des gènes à différents niveaux, en modifiant la structure de la chromatine par exemple (Alexander et al. 2010; Pepin, Pothier, and Barden 1992; Vialou et al. 2013).

Dans un modèle de stress social chronique chez la souris, l'augmentation de la libération de « *corticotropin-releasing hormone* » (CRH ou CRF) a été associée à une diminution de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène *Crf* qui induirait une meilleure accessibilité au transcriptôme, et *in fine* une transcription plus efficace de ce gène (Elliott et al. 2010). De plus, un traitement à l'imipramine empêche l'effet inhibiteur du stress chronique sur la méthylation, et diminue l'expression de l'ARNm du *Crf*, (Elliott et al. 2010). Une autre étude chez le rat soumis à un stress psychosocial chronique montre une augmentation de la

méthylation de l'ADN du gène du BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) dans l'hippocampe (Roth et al. 2011; Boulle et al. 2012).

L'épigénétique ferait donc partie intégrante de la régulation de la réponse au stress durant la vie adulte de l'individu. Ainsi, chez des souris mutantes qui sous-expriment le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Pepin, Pothier, and Barden 1992) montrant ainsi une réponse anormale au stress (Froger *et al.*, 2004), une diminution de l'expression cérébrale de la protéine HDAC-5 (*histone deacetylase protein 5*) – une protéine impliquée dans la régulation épigénétique – a été observée (Massart *et al.*, 2012). De plus, chez le rat, l'augmentation des soins aux nouveau-nés modifie la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène des GR. Cette modification persiste à l'âge adulte et est associée à l'expression de facteurs de transcription qui se fixent au promoteur du gène des GR (Weaver et al. 2004). Cette étude suggère que l'apport de soin au nouveau-né peut influencer sur l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes (*voir paragraphe I.1.3.2*).

Chez l'homme, il est désormais admis une corrélation entre l'exposition à des stress durant l'enfance ou même durant le développement et l'apparition de troubles dépressifs à l'âge adulte. En effet, une publication récente rapporte qu'un stress durant la petite enfance modifie la méthylation de l'ADN des cellules épithéliales buccales à l'adolescence (Essex et al. 2013).

I.1.3. Éléments de physiopathologie

« À l'intérieur de l'histoire des IMAO résident non seulement le secret du traitement de la dépression mais aussi la clé qui nous permettra de parvenir à sa cause et à sa prévention. Une porte est en train de s'ouvrir. Elle nous donnera accès aux mécanismes et aux traitements de la schizophrénie et peut-être de certaines névroses »* dixit Nathan Kline en 1957 (Ayd and Blackwell 1970), *IMAO : inhibiteur des monoamine oxydases.

I.1.3.1.1. Hypothèse monoaminergique

Suite à la découverte des premiers antidépresseurs dans les années 1950, la volonté de comprendre leurs mécanismes d'action a permis de mettre à jour l'implication des monoamines dans les pathologies de l'humeur (Charney, Menkes, and Heninger 1981). Il a été montré, dans un premier temps, *in vitro* chez le rat, que les antidépresseurs tricycliques étaient capables de bloquer le fonctionnement du transporteur de la noradrénaline (Glowinski and Axelrod 1964) et de limiter ainsi la recapture de cette monoamine vers le milieu intracellulaire. De même, Shopsin *et al.* ont montré grâce à un inhibiteur de la synthèse de la sérotonine, la para-chlorophénylalanine (fenclofène), que l'effet antidépresseur des inhibiteurs des monoamine oxydases et des molécules tricycliques dépendait de la production de sérotonine (Shopsin *et al.* 1975; Shopsin B, Friedman E, and Gershon S 1976). Dans les années 1980, des études ont porté directement sur les patients déprimés, montrant par exemple que leurs concentrations urinaires de catécholamines étaient supérieures à celles observées chez des sujets sains (Maas *et al.* 1987). De plus, des études portant sur le tissu cérébral des individus s'étant suicidés ont décrit l'existence de changements à différents niveaux du système monoaminergique : le métabolisme, les récepteurs et les transporteurs des monoamines. Il a été établi, par exemple, une augmentation de l'expression de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme limitante de synthèse des catécholamines, dans le locus coeruleus (LC) (Ordway, Smith, and Haycock 1994), ainsi qu'une augmentation des récepteurs α_2 de la noradrénaline (Ordway *et al.* 1994) et une diminution du transporteur de la sérotonine dans le cortex ventro-latéral (Arango *et al.* 1995). De même, des altérations des seconds messagers impliqués dans les voies de signalisation des récepteurs liés aux protéines G ont été mises en

évidence dans certaines régions cérébrales de personnes décédées par suicide, comme dans le cortex préfrontal (Pacheco et al. 1996).

Par la suite, les études ont surtout porté sur les systèmes sérotoninergique et noradrénergique. Cependant, l'implication du système dopaminergique dans les troubles dépressifs a également été mise en évidence. Un ralentissement de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques induit par les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) a récemment été incriminé pour expliquer leur manque d'efficacité (Dremencov, El Mansari, and Blier 2007). En effet, le système dopaminergique mésolimbique joue un rôle important dans la motivation et la gratification. Il est donc mis en avant dans certaines études comme cible potentielle pour de nouveaux antidépresseurs (Kitaichi et al. 2010; Leggio et al. 2013).

I.1.3.1.2. Hypothèse sérotoninergique

Dans les années 1980, la mise sur le marché de nouveaux antidépresseurs appartenant à la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), dont le chef de file est la fluoxétine (Prozac®), a focalisé les recherches sur le rôle de la sérotonine (5-HT) dans la dépression et a renforcé l'hypothèse sérotoninergique. Auparavant, une étude avait montré une plus faible concentration d'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA), le principal catabolite de la sérotonine, dans le liquide cérébro-spinal de personnes s'étant suicidées (Åsberg M, Träskman L, and Thorén P 1976), suggérant déjà le rôle prépondérant de ce neurotransmetteur dans la dépression. Des observations neuroanatomiques et neurochimiques sont venues étayer cette hypothèse.

Par la suite, plusieurs études ont porté sur le niveau d'expression des récepteurs de la sérotonine chez les patients déprimés. L'une d'entre elles publiée en 1998 suggère une augmentation des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau des noyaux dorsaux et ventro-latéraux du

raphe dans des cerveaux extraits de cadavres de personnes atteintes de troubles dépressifs (Stockmeier et al. 1998). Une étude d'imagerie mesurant les sites de liaison de ces récepteurs a permis d'observer une diminution chez des patients dépressifs, dans le cortex frontal, temporal et limbique (Sargent et al. 2000).

Il a été observé par ailleurs dans le cortex préfrontal des cerveaux de patients une augmentation des hétérorécepteurs post-synaptiques de la sérotonine de type 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}, ainsi qu'une diminution du transporteur de la sérotonine (5-HTT) spécifiquement dans les couches II, III-IV de la zone ventro-latérale (Arango et al. 1995). Cela pourrait être une conséquence d'une diminution du tonus sérotoninergique au niveau préfrontal. De plus, les ARNm des récepteurs 5-HT_{1B} sont retrouvés diminués dans le cortex orbitofrontal et l'hippocampe de cerveaux de patients atteints de troubles de l'humeur (Anisman et al. 2008). Plus récemment, une étude génétique chez l'humain a montré qu'une mutation du gène de la tryptophane hydroxylase-2 (Tph2), l'enzyme responsable de la synthèse de la sérotonine, pouvait favoriser la survenue d'une dépression majeure (Zhang et al. 2005). Les effets de type « dépressiogène » de cette mutation sur le comportement ont été vérifiés dans un modèle de souris « *knock-in* » pour l'allèle muté du gène de la tryptophane hydroxylase-2 (Jacobsen et al. 2012).

L'implication des différents neurotransmetteurs monoaminergiques dans la physiopathologie de la dépression reste cependant limitée par certaines observations. Non seulement la moitié environ des patients ne répond pas aux antidépresseurs monoaminergiques de première intention, mais de plus, 65 % montrent une rémission incomplète avec ce type de traitement et 10 à 20 % n'obtiennent même aucune rémission (Rush et al. 2006).

I.1.3.2. Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

En 1936, Hans Selye, un endocrinologue canadien, a observé la réponse physiologique des rats à diverses agressions physiques (exposition au froid, lésion chirurgicale, intoxication à des drogues diverses...). Il a montré ainsi que certaines réponses apparaissaient quel que soit le dommage engendré (Selye 1936). Il définit alors par l'ensemble de ces symptômes, le syndrome d'adaptation général. Depuis, de nombreuses recherches ont porté sur le stress. Le stress a été défini comme une réponse non spécifique de l'organisme à un stimulus (Selye 1976). De même, un événement stressant (« stressor ») est défini comme un facteur capable de déclencher un stress à tout moment (Selye 1976). Le syndrome d'adaptation général décrit trois phases lors d'un stress : 1) l'alarme, réponse immédiate qui prépare l'organisme à une action rapide; 2) la résistance, adaptation qui permet de compenser les dépenses énergétiques de l'organisme si l'événement stressant persiste et 3) l'épuisement lorsque les ressources sont épuisées obligeant l'organisme à cesser la réponse coûteuse en énergie.

Les études réalisées depuis ont beaucoup porté sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) qui tient un rôle essentiel dans la réponse biologique à un événement stressant. L'hypothalamus reçoit diverses afférences du système nerveux central (SNC) dans son noyau paraventriculaire (PVN) dont les neurones synthétisent la corticolibérine « *corticotropin releasing hormone* » (CRH) et l'arginine/vasopressine (AVP). Ces deux hormones stimulent la libération d'adrénocorticotropine, ou « *adrenocorticotropic hormone* » (ACTH), par l'hypophyse antérieure. L'ACTH stimule ensuite la production de glucocorticoïdes par le cortex de la glande surrénale ou corticosurrénale. Parmi les glucocorticoïdes produits, la corticostérone, synthétisée chez les rongeurs, est le précurseur direct du cortisol synthétisé chez les primates. Ces deux hormones agissent de façon similaire sur leurs organes cibles, via les récepteurs des glucocorticoïdes (GR) et les récepteurs des minéralocorticoïdes (MR).

Alors que les GR ont une faible affinité, mais une forte sélectivité, pour les glucocorticoïdes, les MR ont, eux, une forte affinité, mais sont peu sélectifs, et sont sollicités dans des conditions basales, en l'absence de stress.

Le cortisol est à l'origine de nombreuses actions métaboliques. En particulier, il induit une hyperglycémie et entraîne une lipolyse ainsi qu'une augmentation de la protéolyse. Une fonction majeure chez un individu sain est le rétrocontrôle négatif qu'il exerce sur la production de CRH et d'AVP au niveau de l'hypothalamus. Cette action implique l'activation des récepteurs GR de l'hippocampe et du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN).

Chez les patients dépressifs, il est désormais admis suite à de nombreux travaux que le système de régulation des réponses au stress par l'axe HHS est altéré. En effet, une hypercortisolémie est régulièrement observée (Carroll et al. 2007; Nemeroff and Vale 2005; Pariante and Lightman 2008), sans qu'il n'ait été clairement établi si ce phénomène est une cause ou une conséquence de la dépression. Par ailleurs, dans les années 1980, un déficit de la fonction de rétrocontrôle négatif exercée par les GR a été mise en cause (Carroll et al. 1981; Florian Holsboer 2001; F Holsboer, Doerr, and Sippell 1982). En effet, chez des sujets sains, une administration de dexaméthasone, un agoniste sélectif des GR, engendre une baisse de la cortisolémie, attestant d'un rétrocontrôle négatif exercé à la suite d'une stimulation des GR. Chez des patients atteints de troubles dépressifs en revanche, cette molécule n'induit pas de baisse significative de la cortisolémie révélant une altération de la fonction des RG (Carroll et al. 1981). L'hypothèse qui découle de ces observations est donc qu'un mauvais rétrocontrôle négatif au niveau hypophysaire engendrerait une élévation constante et non transitoire, du cortisol sanguin lors d'un stress. De plus, une réactivité élevée de l'axe HHS, caractérisée par une forte augmentation de glucocorticoïdes circulants face à un stress de contention, a été associée à un comportement de type « dépressif » (Touma et al. 2008). Le taux de cortisol a

d'ailleurs été proposé comme un marqueur de l'efficacité d'un traitement antidépresseur (Horstmann and Binder 2011). Enfin, cette dérégulation de l'axe HHS conduirait à un phénomène de neurotoxicité liée à l'hypersécrétion chronique de glucocorticoïdes. Cela pourrait expliquer l'atrophie hippocampique observée chez les patients dépressifs et la baisse de neurogénèse observée chez modèles rongeurs et primates non-humains (Duman 2002; Frodl and O'Keane 2013) (*voir paragraphe I.1.3.3.2*).

I.1.3.3. Plasticité cérébrale

De nombreuses études mettent aujourd'hui en évidence une réduction de la plasticité neuronale dans les troubles dépressifs majeurs (Krishnan and Nestler 2008; Calabrese et al. 2009). La plasticité neuronale consiste en une série de mécanismes fonctionnels et structurels qui peuvent mener à la réorganisation neuronale, à la formation de nouvelles synapses et à la naissance de nouveaux neurones. En effet, les troubles psychiatriques sont caractérisés par la présence d'altérations structurales et neurochimiques du système limbique (Duman 2002). De telles modifications pourraient augmenter la sensibilité aux événements environnementaux (Calabrese et al. 2009). Plus particulièrement, il a été observé que l'expression de facteurs neurotrophiques comme le BDNF, impliqué dans de nombreux phénomènes dont la croissance neuritique, la différenciation neuronale et la connectivité synaptique, était diminuée dans le plasma (et/ou le sérum) de patients atteints de troubles de l'humeur (Karege et al. 2005; Monteleone et al. 2008; Sen, Duman, and Sanacora 2008). Les traitements antidépresseurs peuvent compenser ces altérations en modulant les mêmes facteurs qui sont déficitaires dans la dépression comme la neurogénèse (Czeh et al. 2001; Lucassen et al. 2001; Anacker et al. 2011; Jun et al. 2012) ou bien les facteurs neurotrophiques (H. Schmidt and Duman 2007). Par exemple, de nombreuses études ont montré qu'un traitement chronique aux antidépresseurs augmente l'expression du BDNF dans différentes régions cérébrales (Castrén

and Rantamäki 2010; Sen, Duman, and Sanacora 2008). Les nouvelles stratégies thérapeutiques ciblent la possibilité d'une réactivation de la plasticité neuronale dans le cerveau des patients atteints de troubles de l'humeur (Manji et al. 2003; Villanueva 2013).

I.1.3.3.1. Observations neuroanatomiques post-mortem et imagerie cérébrale

Les observations neuroanatomiques ont révélé que les circuits cortico-striato-pallido- limbiques présentent des anomalies structurelles et fonctionnelles chez les patients atteints de troubles dépressifs (Drevets, Price, and Furey 2008). Ces anomalies concernent principalement l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal orbital, le striatum ventro-médian, certains noyaux thalamiques médio-dorsaux et médians et le pallidum ventral et sont principalement liées à une réduction du volume de ces structures (Drevets, Price, and Furey 2008).

De plus, grâce aux techniques d'imagerie actuelles (imagerie par résonnance magnétique, tomographie par émission de positons), il est possible d'observer l'activité métabolique des structures cérébrales impliquées dans la régulation des émotions et dans les troubles thymiques. Des changements fonctionnels plus complexes ont pu être ainsi observés, tels qu'une augmentation du flux sanguin dans les régions limbiques et paralimbiques (Frodl and O'Keane 2013; Kennedy et al. 2001) et, au contraire, une diminution dans le cortex préfrontal latéral (Baxter LR et al. 1989; Bench et al. 1992; Biver et al. 1994).

L'hippocampe est impliqué dans des fonctions cognitives et de mémoire, mais également dans le contrôle des émotions. De plus, il fait partie intégrante de l'axe HHS qui régule la réponse hormonale au stress (*voir paragraphe I.1.3.2.*). Le volume de cette région est trouvé significativement réduit chez les individus dépressifs dans la plupart des études d'imagerie

par résonnance magnétique (Sheline 2000; MacQueen et al. 2003; Videbech and Ravnkilde 2004; Lorenzetti et al. 2009). Cette réduction n'est, le plus souvent, influencée ni par l'âge, ni par la gravité de la maladie au moment de l'imagerie, mais par la chronicité de la pathologie, à savoir le fait d'être atteint depuis longtemps ou d'avoir supporté plusieurs épisodes dépressifs majeurs (quelle qu'en soit la gravité) (MacQueen et al. 2003; McKinnon et al. 2009; Lorenzetti et al. 2009). Ces données récentes suggèrent qu'une modification de la structure de l'hippocampe est une caractéristique critique de la physiopathologie de la dépression.

Par ailleurs, certains individus décédés par suicide ((Monkul et al. 2006) et patients dépressifs (Bremner et al. 2002; Lacerda et al. 2004) ont présenté une réduction du volume leur cortex préfrontal (en particulier la zone orbito-frontale), une structure également impliquée dans un bon nombre de fonctions sensorielles et cognitives telles que l'intégration de stimuli sensoriels, le comportement émotionnel, la motivation, la prise de décision, la récompense ou bien encore l'aversion (Drevets, Price, and Furey 2008; Rajkowska 2000).

I.1.3.3.2. Altérations cellulaires

Les diminutions de volume des régions précitées peuvent être mises en relation avec une réduction de la neurogenèse (Elizabeth Gould et al. 2000), une altération de la plasticité neuronale (Duman 2002) et une neurotoxicité liée à l'hyperactivité corticotrope (Goosens and Sapolsky 2007).

A l'âge adulte, la neurogénèse (formation de nouveaux neurones matures à partir de cellules souches neurales) a lieu dans le gyrus denté de l'hippocampe. Les hormones stéroïdes ainsi que les expériences aversives ou enrichissantes sont connues pour influencer positivement ou négativement la neurogénèse (Elizabeth Gould et al. 2000). Ainsi chez le rongeur, les

œstrogènes ont un rôle stimulant (Elizabeth Gould et al. 2000), alors que la corticostérone a un rôle répressif (E. Gould et al. 1992) sur ce phénomène. De plus, une expérience dite « aversive » (environnement pauvre, isolement) diminue la production de nouveaux neurones alors qu'une expérience dite « enrichissante » (activité physique, environnement enrichi ou nouvel apprentissage) favorise la survie de ces nouvelles cellules hippocampiques (Kempermann, Kuhn, and Gage 1997). Lors d'un stress psychosocial chronique chez une espèce proche du primate, le toupaye de Belanger, une diminution de la prolifération cellulaire a été observée dans l'hippocampe (E Gould et al. 1997). L'ensemble des travaux sur le sujet suggère qu'un environnement stressant peut, par l'intermédiaire du cortisol ou de la corticostérone, inhiber la prolifération cellulaire dans le gyrus denté.

De plus, chez les patients décédés par suicide, une atrophie des neurones hippocampiques de la région CA3 a été observée (Sapolsky, 2000). Ce phénomène est également retrouvé dans des modèles animaux. En effet, une réduction du nombre et/ou de la taille des dendrites a été observée dans le stress de contention chez le rat (McEwen et al. 1995), le stress social chez le rongeur (McKittrick et al. 2000) ou le stress psychosocial chronique chez le toupaye de Belanger (Magariños et al. 1996). De même, des altérations structurales au niveau cellulaire ont été retrouvées dans le cortex orbitofrontal et dans le cortex préfrontal de patients ayant été diagnostiqués avec des troubles dépressifs majeurs et décédés par suicide (Rajkowska 2000). En effet, une diminution de la taille du corps cellulaire des neurones est accompagnée par une diminution du volume général du cortex orbitofrontal de ces individus. De même, la taille des corps cellulaires et la densité des neurones les plus larges sont diminuées dans le cortex préfrontal (Rajkowska 2000).

I.1.3.4. Hypothèse glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur majoritaire, présent dans plus de 80 % des neurones. De ce fait, il a longtemps été considéré comme ubiquitaire et non spécifique. Depuis la découverte de son implication dans la plasticité neuronale, la mémoire et l'apprentissage (Malenka and Nicoll 1999), il constitue une nouvelle cible thérapeutique pour les maladies psychiatriques. De plus, une diminution du glutamate et de la glutamine a été retrouvée dans le cortex préfrontal dorsomédial et dorsoantérolatéral (Hasler et al. 2007), ainsi que dans l'hippocampe et l'amygdale (Yüksel and Öngür 2010) chez des sujets atteints de troubles dépressifs.

Récemment, de nombreuses études ont été réalisées sur un antagoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), la kétamine, et ont mis en évidence un rôle potentiel du système glutamatergique dans la pathologie et le traitement de la dépression (Mathews, Henter, and Zarate 2012; Catena-Dell'Osso et al. 2013; Katalinic et al. 2013) (*voir paragraphe I.1.3.2*).

I.2. THÉRAPEUTIQUE ANTIDÉPRESSIVE

Comme précédemment décrit, la découverte des antidépresseurs dits « conventionnels », puis l'élucidation de leurs mécanismes d'action, ont permis de démontrer l'implication des systèmes monoaminergiques dans la dépression, de façon complémentaire avec les observations neuroanatomiques. Trois grandes classes constituent les antidépresseurs classiquement utilisés : il s'agit des inhibiteurs de monoamines oxydases (IMAO), des tricycliques et enfin des inhibiteurs sélectifs comme les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) ou mixtes comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) (*Voir Figure I.2*).

I.2.1. Classification

I.2.1.1. Inhibiteurs des monoamine oxydases

Type	Molécule	Cible principale	Action via	Effets secondaires principaux
IMAO	Phenelzine (NARDIL)	MAO-A and B	NE, 5-HT, DA	Problèmes sexuels + Interaction alimentaire
	Tranylcypromine (PARNATE)	MAO-A and B	NE, 5-HT, DA	Agitation, Sexuels + Interaction alimentaire
	Selegiline (ELDEPRYL)	MAO-B	?NE, ?5-HT, DA	+/- Interaction alimentaire
Tricyclique	Amitriptyline (ELAVIL, ...)	Inhibiteurs capture NE et 5-HT	NE, 5-HT	Sédation Hypotension Effets anti-cholinergique
	Doxepine (ADAPIN, SINEQUAN)	Inhibiteurs capture NE et 5-HT	NE, 5-HT	Effets cardiaques, attaques
	Imipramine (TOFRANIL, ...)	Inhibiteurs capture NE et 5-HT	NE, 5-HT	Gain de poids Problèmes sexuels
	Clomipramine (ANAFRANIL)	Inhibiteurs capture 5-HT	NE, 5-HT	
	Desipramine (NORPRAMIN)	NE	NE	Effets cardiaques, problèmes sexuels
ISRS	Fluoxétine (PROZAC)	SERT (ratio > 10 affinité SERT/ affinité NET)	Effet direct sur 5-HT: 1) Augmentation synaptique de la concentration de 5-HT 2) Les auto-récepteurs sérotoninergiques inhibent le relargage de 5-HT 3) Régulation de l'expression des auto-récepteurs et action sur les récepteurs post-synaptiques => effets antidépresseurs	Problèmes sexuels Problèmes gastro-intestinaux
	Paroxétine (PAXIL)			
	Sertraline (ZOLOFT)			
	Citalopram (CELEXA)			
	Escitalopram (LEXAPRO)			
	Fluvoxamine (LUVOX)		Effet indirect, par le biais des récepteurs sérotoninergiques	
IRSNa	Venlafaxine (EFFEXOR)	SERT	Action sur SERT idem que pour les ISRS	Effets gastro-intestinaux, problèmes sexuels
	Duloxétine (CYMBALTA)	NERT		Un peu de tout, pas d'effets secondaires majeurs
	Milnacipran (XEL)			Un peu de tout, pas d'effets secondaires majeurs
Autres:	Bupropion (WELLBUTRIN, ZYBAN)	recapture des catécholamines (NE, DA) sur NET, DAT et VMAT2 (vesicular monoamine transporter)	DA, NE?	Agitation, Attaques, Problèmes gastro-intestinaux
	Trazodone (DESYREL) Nefazodone (SEIZONE)	antagoniste des récepteurs 5-HT2	5-HT	Sédation, Problèmes gastro-intestinaux
	Mirtazapine (REMÉRON, ...) Miansérine	antagoniste des récepteurs 5-HT2	5-HT	Sédation, augmentation de l'appétit, prise de poids

Figure I.2. : Tableau récapitulatif des différents types d'antidépresseurs

L'histoire des antidépresseurs commence dans les années 1950. En effet, le docteur Nathan Kline, psychiatre américain, montre chez ses patients l'effet sur l'humeur de l'isoniazide, un inhibiteur des monoamines oxydases, développé initialement pour le traitement de la

tuberculose (Bloch et al. 1954; Loomer, Saunders, and Kline 1957). On lui a remis le prix Albert-Lasker pour ces travaux.

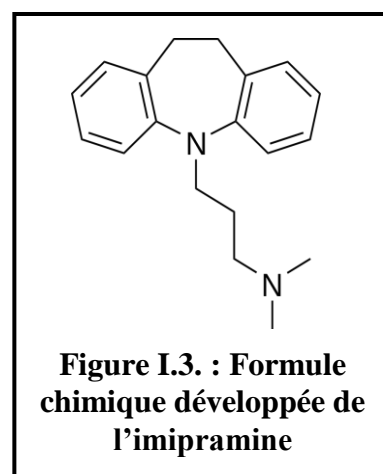
Les monoamines oxydases (MAO) participent au catabolisme des monoamines par l'oxydation de leur fonction amine en aldéhyde. Elles se situent sur la membrane externe des mitochondries. L'inhibition de leur fonction par un inhibiteur (IMAO) induit une diminution de la dégradation de toutes les monoamines de façon non spécifique.

Le premier IMAO utilisé contre la dépression fut l'iproniazide, un inhibiteur irréversible. Les inhibiteurs irréversibles présentent cependant des effets secondaires considérables (Henry 1992) qui conditionnent leur utilisation à un suivi médical très strict (*voir paragraphe I.2.2.3*).

Les premiers IMAO étaient non spécifiques et bloquaient à la fois les MAO de types A et B. Il a été développé, depuis, des inhibiteurs réversibles et spécifiques de la monoamine oxydase A, ces molécules étant beaucoup mieux tolérées par les patients. Cependant, aujourd'hui les IMAO sont très peu utilisés, comparés aux molécules agissant spécifiquement sur le système sérotoninergique et/ou noradrénergique.

I.2.1.2. Tricycliques

Après la libération de monoamines dans la synapse, des transporteurs présynaptiques ont pour fonction d'assurer la recapture de la monoamine dont ils sont spécifiques (sérotonine, noradrénaline ou dopamine) et de la recycler à l'intérieur du compartiment présynaptique. L'imipramine, la clomipramine, la démexiptiline, la désipramine, la amitriptyline sont des antidépresseurs tricycliques (ATC).



Les ATC possèdent trois cycles aromatiques (*Figure I.3.*).

Ils agissent sur la recapture des monoamines, principalement de la noradrénaline et de la sérotonine. Le premier tricyclique, l'imipramine, a été développé dans les années 1950 à partir de la chlorpromazine, un antihistaminique dont les effets antidépresseurs ont été testés sur des patients à partir de 1955 par le psychiatre suisse Roland Khun (Kuhn 1958).

I.2.1.3. Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)

Il a été développé au début des années 1970, des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS). Cependant, si ces inhibiteurs sont dits « sélectifs », ils ne le sont, en réalité, jamais totalement. En effet, ils se fixent avec différentes affinités sur les trois types de transporteurs de monoamines : SERT (sérotonine), NET (noradrénaline), DAT (dopamine). De plus, ils peuvent également avoir une action sur d'autres récepteurs : la paroxétine, par exemple, agit également sur les récepteurs muscariniques ce qui lui confère des effets secondaires supplémentaires tels que la constipation (Marks et al. 2008). Chaque inhibiteur sélectif agit de façon directe ou indirecte sur les différents systèmes, dans les différentes régions cérébrales (Kitaichi et al. 2010).

Le premier ISRS utilisé comme antidépresseur est la fluoxétine, un dérivé d'antihistaminique de première génération, la diphenhydramine, développée par le laboratoire *Eli Lilly and company*. En 1988, l'*US Food and Drug Administration* donne l'autorisation de mise sur le marché de la fluoxétine (Prozac®). Ce nouveau médicament avait l'avantage par rapport aux anciens d'une meilleure efficacité, de ne pas être toxique lors d'une overdose, d'avoir des effets secondaires plus tolérables et le plus souvent, de ne pas nécessiter de régime particulier, contrairement aux IMAO (*voir paragraphe I.2.2.3*). Depuis, de très nombreux autres ISRS ont été développés avec une sélectivité plus grande pour le SERT et encore moins d'effets secondaires. La sertraline (Zoloft®), la fluvoxamine (Luvox®), la paroxétine (Deroxat®), le

citalopram (Seropram[®]) et l'escitalopram (Seroplex[®]) font partie de cette classe thérapeutique. Cependant, leur délai d'action reste toujours aussi important et environ un tiers des patients ne répond pas du tout à ce type de traitement (*voir paragraphe I.2.2.1*).

I.2.1.4. Antidépresseurs atypiques

Les antidépresseurs atypiques sont apparus vers la fin des années 1990. Ils possèdent des propriétés qui associent plusieurs mécanismes d'action connus et gardent pour cible les systèmes monoaminergiques centraux.

Ainsi la venlafaxine (Effexor[®]), la duloxétine (Cymbalta[®]), de même que le milnacipran (Ixel[®]) sont utilisés comme inhibiteurs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN). Certains antidépresseurs n'agissent pas uniquement sur la recapture de la sérotonine, mais peuvent augmenter leur efficacité en agissant en parallèle sur des récepteurs sérotoninergiques. Le trazodone (Desyrel[®]), par exemple, est un inhibiteur de la recapture sélective de la sérotonine et un antagoniste de récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}. La buspirone (Buspar[®]) est un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} et antagoniste des récepteurs D2 dopaminergiques, utilisé le plus souvent comme anxiolytique, mais avec une activité antidépressive associée. La vilazodone (ViiBryd[®]) a également une action directe sur les récepteurs 5-HT_{1A}. Cette action agoniste augmenterait la vitesse de désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} (Page et al. 2002) et ainsi permettrait ainsi de réduire le délai d'action de l'antidépresseur (*voir paragraphe I.2.2.1*). La mirtazapine (Norset[®]) est, elle, une molécule tétracyclique qui agit comme antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} et 5-HT₃ sérotoninergiques et α_2 noradrénergiques, conduisant à une augmentation synaptique des monoamines.

Il existe également des molécules agissant sur le système dopaminergique comme le bupropion (Zyban[®]), un inhibiteur mixte de la recapture de la noradrénaline et de la

dopamine. Il agit également comme antagoniste des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine tels que l' $\alpha 7$ et est utilisé pour le sevrage tabagique.

Enfin, l'agomélatine (Valdoxan®) présente un mécanisme d'action particulier puisqu'elle agit sur le système mélatoninergique en stimulant les récepteurs MT₁ et MT₂ de la mélatonine, ce qui lui confère des propriétés sur le sommeil. Cependant, cette action n'est pas sélective dans la mesure où l'agomélatine possède également une action antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} conduisant à une élévation du tonus dopaminergique.

I.2.2. Limites des antidépresseurs conventionnels

I.2.2.1. Délai d'action des ISRS

Le délai d'action des antidépresseurs se situe entre 3 semaines pour la désipramine (ATC) et 13 jours pour la paroxétine (ISRS) (Katz et al. 2004). Dans l'hypothèse classiquement admise, ce délai d'action serait lié au temps nécessaire à la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}. Cette hypothèse a été particulièrement vérifiée pour les ISRS (P. Blier and Montigny 1983; Chaput, de Montigny, and Blier 1986; Lanfumey et al. 2008). En effet, l'action immédiate des ISRS est de bloquer la recapture de la sérotonine en inhibant l'action de son transporteur spécifique (SERT). A court terme, cela engendre une augmentation de la concentration de sérotonine dans le compartiment extracellulaire au niveau des zones de projection des neurones sérotoninergiques. Mais cette augmentation de sérotonine se produit également dans la région du raphé où se situent les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques. A ce niveau, se trouvent les autorécepteurs sommatodendritiques de type 5-HT_{1A}, qui, lorsqu'ils sont stimulés, exercent une action auto-inhibitrice sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques. La « suractivation » des autorécepteurs 5-HT_{1A} suite au blocage de SERT a pour conséquence une réduction globale de la transmission sérotoninergique. Les taux de sérotonine dans les zones de projection des neurones

sérotoninergiques sont donc inchangés dans les premiers jours d'un traitement par les ISRS. Ce phénomène serait la cause de l'inefficacité des ISRS au début du traitement (Hamon and Blier, 2013).

Lors d'un traitement à long terme par un ISRS, une désensibilisation progressive des autorécepteurs présynaptiques 5-HT_{1A} a été observée suite à leur stimulation prolongée par la sérotonine. Cela conduit à une levée de leur fonction de rétrocontrôle inhibiteur et permet une augmentation massive de la libération de sérotonine dans les structures cérébrales antérieures, telles que l'hippocampe ou le cortex cérébral (Chaput, de Montigny, and Blier 1986; P. Blier, de Montigny, and Chaput 1990; Bortolozzi et al. 2012).

La relation entre l'efficacité des antidépresseurs et la désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} a été montrée chez la souris. Par exemple, une étude montre un effet antidépresseur de l'inhibition de l'expression de ces récepteurs par des ARN interférents (Bortolozzi et al. 2012).

I.2.2.2. Efficacité

L'action sur les systèmes monoaminergiques des antidépresseurs classiques ne semble pas suffisante puisqu'il apparaît qu'ils ne sont efficaces que chez environ un tiers des patients dépressifs (Insel and Scolnick 2006; Trivedi et al. 2006). Plus précisément, une étude récente qui ne prenait en compte que les traitements jugés « adéquats » (avec une dose et une durée convenables) a montré qu'une proportion comprise entre 29 et 46 % des patients ne répondait pas complètement aux antidépresseurs classiques. Parmi eux, 12 à 15 % ne répondaient que partiellement alors que 19 à 34 % ne répondaient pas du tout (Fava and Davidson 1996). De plus, les études de résistance aux traitements antidépresseurs surestiment souvent la survenue d'une résistance en prenant en compte les cas de patients dont la dose administrée n'était pas la bonne ou bien ne poursuivant pas le traitement. Cependant, une sous-estimation est

possible si le patient abandonne son traitement avant la fin de l'étude pour cause de non-efficacité. Les causes de ce manque d'efficacité sont loin d'être élucidées même si de nombreuses études portent aujourd'hui sur les mécanismes de résistance aux antidépresseurs actuels (El-Hage et al. 2013).

1.2.2.3. Effets secondaires

Même en cas d'efficacité avérée, les antidépresseurs conventionnels présentent de nombreux effets secondaires qui peuvent conduire les patients à arrêter leur traitement. Les effets secondaires constituent donc un frein à l'efficacité des traitements antidépresseurs.

Les IMAO (surtout irréversibles) sont la classe d'antidépresseurs qui possède la plus grande sévérité d'effets secondaires. Ils peuvent provoquer une crise d'hypertension artérielle lorsqu'ils sont pris en association avec un régime riche en tyramine, monoamine abondamment présente dans le fromage, la viande ou encore le vin rouge. En effet, l'excès de tyramine induit une libération anormale de noradrénaline. Cette libération engendre une vasoconstriction, ainsi qu'une élévation du rythme cardiaque (Blackwell and Mabbitt 1965; Flockhart 2012).

Les principaux effets secondaires des tricycliques sont dus à un effet antagoniste des récepteurs muscariniques (sècheresse buccale, constipation, confusion mentale, etc.), un effet antagoniste des récepteurs α_2 -adrenergiques (hypotension orthostatique, tachycardie réactionnelle) et enfin, un effet antagoniste des récepteurs histaminiques de type H1 (sédation, prise de poids). En 1994, on jugeait que 19 % des patients présentaient une discontinuité dans leur traitement en raison des effets secondaires des antidépresseurs tricycliques (Montgomery et al. 1994).

Les principaux effets secondaires des ISRS sont des troubles gastro-intestinaux, mais aussi des troubles du sommeil et une baisse de la libido qui durent environ un mois, au début du traitement. Les effets secondaires, moins importants aujourd'hui avec les nouveaux ISRS, sont néanmoins encore la cause de traitement discontinu pour 14,9 % des patients (Hamon and Bourgoin 2006).

I.2.3. Nouvelles voies thérapeutiques

I.2.3.1. Action sur les systèmes monoaminergiques

Les ISRS sont les antidépresseurs les plus utilisés aujourd'hui. Ils exercent leur action en augmentant la disponibilité de la sérotonine synaptique. Cependant des modifications cellulaires pré et post-synaptiques sont nécessaires à l'efficacité de ceux-ci. Et le délai d'action des antidépresseurs correspond à la durée permettant d'induire ces modifications (de Montigny and Aghajanian 1978; Pierre Blier and de Montigny 1999) (*voir paragraphe I.2.2.1*).

Ainsi, il a été montré, par exemple que les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2c} avaient une action inhibitrice sur l'activité neuronale sérotoninergique du noyau dorsal du raphe via l'activation de neurones GABAergiques (Boothman et al. 2006). L'activité de ces récepteurs engendre également une inhibition de l'activité dopaminergique dans le striatum et le noyau accumbens de rats anesthésiés (Deurwaerdère et al. 2004). Ces phénomènes d'inhibition neuronale semblent jouer un rôle dans la pathologie et le traitement de la dépression. En effet, des victimes suicidées ont présenté dans le cortex préfrontal une édition (modification post-transcriptionnelle) particulière de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2c} par rapport à des personnes témoins (Niswender et al. 2001). De plus, l'administration d'ISRS induit une réduction de l'activité des neurones dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale de rats anesthésiés via ces récepteurs (Dremencov, Mansari, and Blier 2009). C'est ainsi que les récepteurs 5-HT_{2c}

constitueraient une nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans la dépression. Il a en effet été suggéré récemment que des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C} pourraient être utilisés, en combinaison avec les ISRS, chez des patients résistants (Dremencov, Mansari, and Blier 2009). L'agomélatine, par exemple, est un agoniste des récepteurs à la mélatonine MT₁ et MT₂ et un antagoniste du récepteur sérotoninergique 5-HT_{2C} (de Bodinat et al. 2010; Racagni et al. 2011). Elle a donc, en plus de son action sur les rythmes circadiens via la mélatonine, une action sur le système sérotoninergique et dopaminergique via les récepteurs 5-HT_{2C}.

Des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ ont également montré un intérêt puisqu'ils semblent, par exemple, potentialiser l'effet d'un ISRS, chez le rat (Bétry et al. 2015). De même, ils montrent des effets antidépresseurs sur un modèle de stress chronique modéré (CUMS) chez la souris (Bhatt et al. 2014). De la même manière, des études ont montré un effet antidépresseur des agonistes des récepteurs 5-HT₄ avec une efficacité d'action plus rapide que les ISRS dans des modèles rongeurs (Vidal et al. 2014) tels que la bulbectomie olfactive engendrant une hyperactivité ou la diminution d'absorption de sucrose après CUMS (Lucas et al. 2007).

Enfin, les récepteurs 5-HT₇ ont également été récemment impliqués dans le traitement de la dépression (Hedlund 2009; Mnie-Filali et al. 2009). En effet, dès la découverte de ce récepteur sérotoninergique, il a été évoqué une certaine affinité des antidépresseurs tricycliques tels que l'amitriptyline ou tétracycliques tels que l'amoxapine pour celui-ci (Monsma et al. 1993). Depuis, il est envisagé que les antagonistes des récepteurs 5-HT₇ pourraient être utilisés comme antidépresseurs. Ils préviendraient des effets anxiogénique des ISRS en début de traitement et accéléreraient leur action antidépressive (Mnie-Filali et al. 2011).

I.2.3.2. Action sur le système glutamatergique

La kétamine est utilisée comme anesthésique depuis les années 1960. Cependant, elle a toujours été également connue pour avoir des effets euphorisants. Très récemment, la kétamine a été testée en injection intraveineuse aiguë sur des patients résistants aux antidépresseurs conventionnels (DiazGranados et al. 2010). Elle semble avoir une efficacité très rapide puisqu'une diminution des symptômes est observée dès la deuxième heure après l'injection (Zarate *et al.* 2006; Price et al. 2009). En particulier, la kétamine inhiberait les idées suicidaires. Cela pourrait être utile pour éviter le passage à l'acte en début de traitement avec des antidépresseurs classiques (Rajkumar et al. 2015).

C'est un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA. Elle se fixe sur son site allostérique, inhibant le passage d'ion calcium dans la cellule (Anis et al. 1983). Son mécanisme d'action n'est pas tout à fait élucidé, cependant il a été montré que la kétamine agit sur la transcription de nombreuses protéines synaptiques ainsi que sur le nombre d'épines dendritiques dans le cortex préfrontal de rat via la voie de signalisation mTOR (cible de la rapamycine) (N. Li et al. 2010). Tout comme les ISRS, la kétamine stimule la production de BDNF, ce qui suggère que l'effet antidépresseur de la kétamine est associé à son action neurotrophique. Mais, contrairement aux effets obtenus avec les ISRS, l'effet neurotrophique de la kétamine est quasi immédiat puisqu'il est obtenu par une injection unique de kétamine (DiazGranados et al. 2010).

Cependant, les études précliniques et cliniques en cours montrent que la première génération d'antagonistes des récepteurs NMDA, comme la kétamine, ont un effet antidépresseur facilement réversible, associé à des effets secondaires non négligeables tels que des effets psychotomimétiques, et un potentiel effet de dépendance (Willetts, Balster, and Leander 1990; Krystal et al. 1994).

Des antagonistes des récepteurs métabotropiques mGluR5 (récepteur couplé à une protéine Gq), le 2-méthyl-6-(phényléthynyl)-pyridine (MPEP) et le 3-[(2-méthyl-4-thiazolyl)éthynyl]-pyridine (MTEP), ont également montré une certaine efficacité sur des modèles rongeurs de dépression (Tatarczyńska et al. 2001; X. Li et al. 2006; Belozertseva et al. 2007). Leur efficacité semble être similaire à celle de la kétamine, mais les effets secondaires sont moindres (Inta et al. 2012).

I.2.3.3. Neuropeptides

La piste thérapeutique des antagonistes des récepteurs de la substance P de type NK1 était très prometteuse. En effet, à la fin des années 1990, Kramer *et al* ont montré chez l'homme que le MK-869 était aussi efficace sur les troubles dépressifs que la paroxétine (M. S. Kramer et al. 1998). Chez l'animal, cette famille de molécules, comme le L-760735, est connue pour avoir une action sur différents tests d'anxiété (Varty et al. 2002), mais également pour avoir des effets comparables aux antidépresseurs classiques (Rupniak 2002). L'antagoniste, NKP608, montre un effet antidépresseur sur le stress chronique modéré chez le rat (Papp, Vassout, and Gentsch 2000). De plus, les antagonistes des récepteurs NK1 ont même montré leur efficacité dans le modèle de stress psychosocial chronique chez le toupaye de Belanger (van der Hart 2002). Toutefois les phases d'essai clinique chez l'Homme n'ont pas abouti. Depuis quelques années, le travail de recherche dans ce domaine a repris et une certaine efficacité des nouveaux antagonistes a été montré comme celle du casopitant et de l'orvepitant (Ratti et al. 2011; Di Fabio et al. 2013).

I.3. IMPLICATIONS DES MICROTUBULES DANS LA DÉPRESSION

Il est désormais admis que le cerveau des patients dépressifs est affecté par des altérations structurales et fonctionnelles (*voir paragraphe I.1.3.3.1*) dans certaines régions cérébrales impliquées dans la régulation des émotions (*voir paragraphe I.1.3.3.2*). Or, la structure

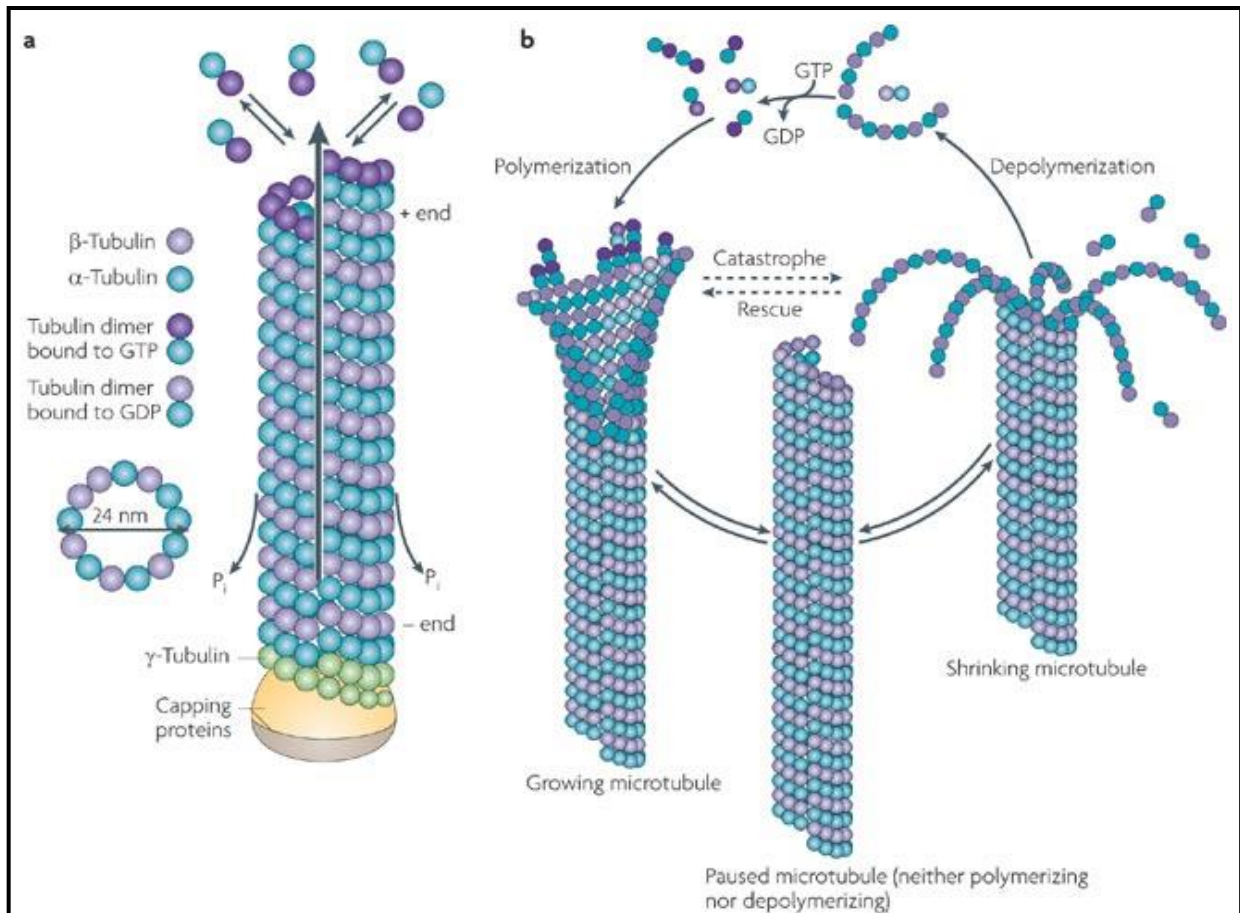
physique et le fonctionnement synaptique des cellules du système nerveux sont dépendants de leur squelette, appelé cytosquelette. Les microtubules sont une partie primordiale du cytosquelette des cellules du système nerveux. En effet, ils ont un rôle dans la morphologie des cellules, dans la construction des synapses et dans le transport cellulaire. Ces modifications structurales et fonctionnelles qui peuvent avoir lieu lors de troubles dépressifs impliqueraient donc le système microtubulaire des cellules nerveuses.

I.3.1. Les microtubules, élément dynamique du cytosquelette

I.3.1.1. Nature et fonction des microtubules

Les microtubules, dont le diamètre est de 24 nm (Wade 2009), sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ils représentent l'un des trois constituants du squelette de ces cellules avec les filaments d'actine que l'on trouve en grande quantité dans les fibres musculaires et les filaments intermédiaires qui ont entre-autre rôle la fixation des organites dans la cellule. Ils jouent un rôle clef dans de nombreux processus cellulaires. En effet, en tant que structures rigides, ils permettent à la cellule de posséder et de garder sa morphologie spécifique ainsi que de constituer des axes de transport intracellulaires (Dent and Baas 2014). L'un de leurs rôles fondamentaux est la formation du fuseau mitotique lors de la mitose (O'Connell and Khodjakov 2007; Walczak and Heald 2008). De plus, ils permettent l'existence d'une polarité cellulaire en particulier dans les neurones (Hoogenraad and Bradke 2009).

Les constituants élémentaires des microtubules sont les tubulines α et β . Il existe, dans le cytoplasme, des hétérodimères libres composés d'une tubuline α et d'une tubuline β . Ces dimères peuvent s'assembler linéairement pour former des protofilaments ayant une extrémité exposant une tubuline α et l'autre exposant une tubuline β (Figure I.4.). Chaque fois qu'un dimère s'ajoute au protofilament, la guanosine triphosphate (GTP) associée à la tubuline β exposée du protofilament est hydrolysée en guanosine diphosphate (GDP)



© 2009 Nature Publishing Group Conde, C. & Cáceres, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nature Reviews Neuroscience 10, 319-332 (2009)

Figure I.4 : Assemblage des microtubules et processus d'instabilité dynamique

Schéma illustrant la dynamique des microtubules. Un dimère de tubulines α et β peut s'ajouter au microtubule déjà formé, la GTP associée à la tubuline β du dimère sera alors hydrolysée en GDP. La taille du microtubule dépend de l'équilibre entre un phénomène de croissance « rescue » et un phénomène de décroissance rapide « catastrophe ».

(Kobayashi 1975). Chez les mammifères, environ 13 protofilaments s'associent latéralement pour former un tube appelé « microtubule ». Le microtubule possède une extrémité positive « + » exposant les tubulines β et une extrémité négative « - » exposant les tubulines α (*Figure I.4*). La polymérisation des microtubules est réalisée en trois phases. La première phase est la nucléation qui a lieu au niveau d'un centre particulier de la cellule, le centrosome. Il se forme alors un début de polymère. La seconde phase est l'élongation qui consiste en l'ajout d'hétérodimères aux deux extrémités du microtubule. Cependant, *in vivo*, l'extrémité (-) se lie rapidement au centrosome tandis que l'extrémité (+) continue de croître. Enfin, l'état d'équilibre est la troisième phase de polymérisation. Durant cette phase, la longueur du microtubule est constante et résulte d'une polymérisation et d'une dépolymérisation équivalentes dans le temps. C'est l'instabilité dynamique (*Figure I.4*).

En effet, les phases de croissance du microtubule se nomment « rescue ». Durant ces phases, l'extrémité (+) a une croissance plus rapide que l'extrémité (-). Elle possède une coiffe de GTP (non encore hydrolysée) liée aux tubulines β , qui stabilise la structure du microtubule (*Figure I.4*). En revanche, lorsque cette coiffe est perdue ou très diminuée, les protofilaments se détachent et le microtubule se dépolymérise. C'est une décroissance rapide dite « catastrophe ».

Durant la phase d'équilibre, la concentration d'hétérodimères libres dans le cytoplasme et la concentration d'hétérodimères polymérisés sont égales. De manière générale, les changements de concentration de tubulines libres vont modifier la polymérisation des microtubules. Cependant, il existe d'autres facteurs agissant sur la nucléation et la dynamique comme les protéines associées aux microtubules (MAP).

I.3.1.2. MAP2, protéine structurale associée aux microtubules

On peut distinguer plusieurs types de MAP. Il existe, par exemple, des MAP spécialisées dans le transport cellulaire, comme les kynésines et les dynéines, qui se déplacent le long des microtubules pour acheminer des organelles ou des vésicules (Roberts et al. 2013; Vale, Reese, and Sheetz 1985). En revanche, les protéines comme MAP1, MAP2, Tau ou MAP4 sont des MAP structurales. Elles se fixent aux microtubules et modifient leur vitesse de nucléation et leur stabilité (Dehmelt and Halpain 2005; Halpain and Dehmelt 2006). De plus, elles peuvent participer également à la configuration du système microtubulaire en déterminant l'espace entre les microtubules, dans la cellule. Par exemple, elles fixent la distance entre les microtubules dans les dendrites et les axones (Chen et al. 1992; Lewis and Cowan 1990).

Alors que MAP1 est une famille de protéines particulièrement importante dans le développement du système nerveux central (Halpain and Dehmelt 2006), MAP2 et Tau sont présentes également dans le cerveau adulte. MAP4, en revanche, est exprimé dans d'autres tissus que le système nerveux. De plus, si Tau et MAP2 sont de la même famille, elles sont plus particulièrement exprimées soit dans les axones pour Tau (Hirokawa et al. 1996), soit dans les dendrites pour MAP2 (Caceres et al. 1984; Hirokawa et al. 1996). Elles servent à ce titre de marqueurs spécifiques de ces deux régions sub-neuronales.

MAP2 possède deux domaines distincts. Le site de fixation au microtubule, consistant en la partie C-terminale de la protéine, est un domaine de répétition du motif KXGS, très conservé (Lewis, Wang, and Cowan 1988) et susceptible d'être phosphorylé (Drewes et al. 1995). D'autre part, le domaine de projection, partie N-terminale, a une taille variée en fonction de l'isoforme de MAP2 (Kalcheva et al. 1995). En effet, il existe différentes MAP2 (a, b, c, d) spécifiques du tissu biologique et du stade de développement de l'organisme. MAP2 fixée sur

les microtubules a un rôle stabilisateur puisqu'elle apporte une plus grande rigidité (Felgner et al. 1997) et une meilleure stabilité (Mandelkow and Mandelkow 1995) de la structure microtubulaire, *in vitro*. Ainsi, elle favorise la polymérisation de la tubuline en microtubule (Itoh and Hotani 2004).

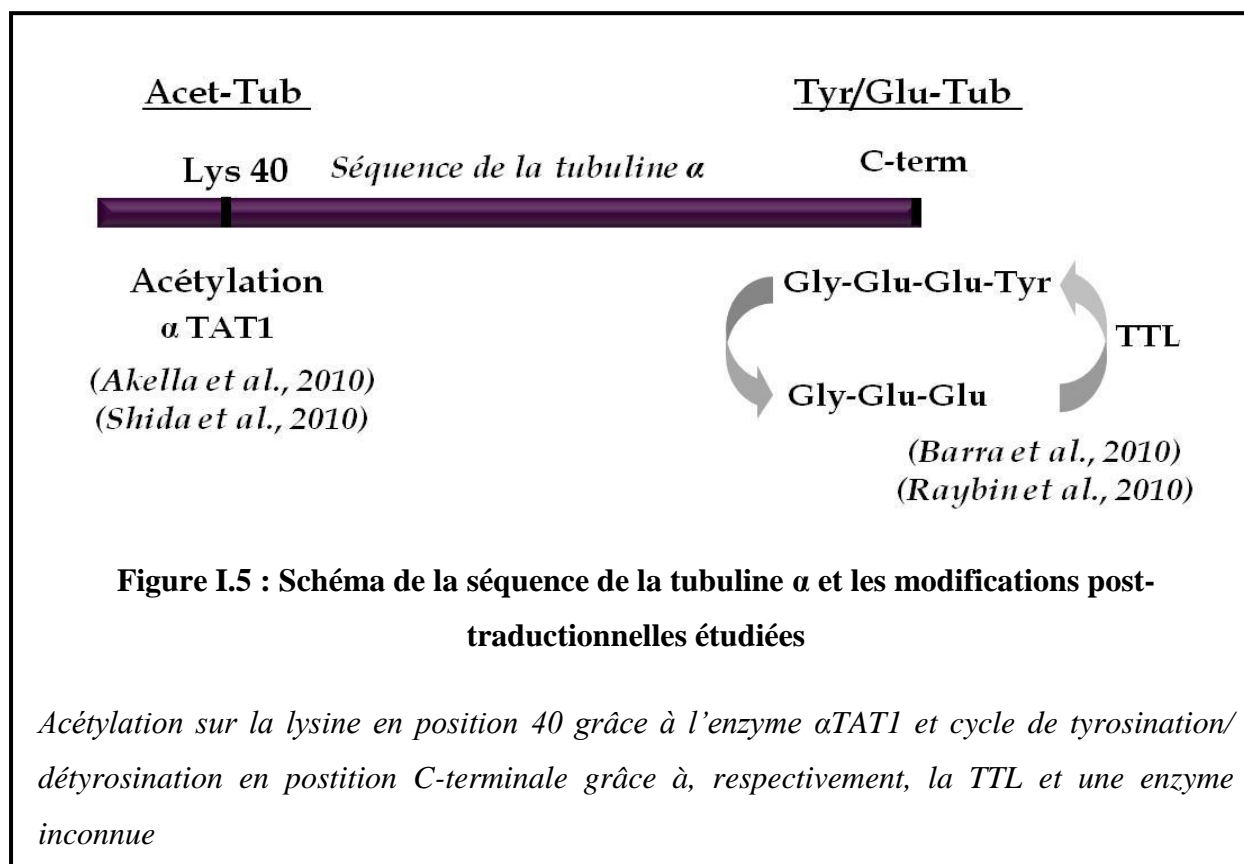
De plus, son action dépend de sa phosphorylation. En effet, il existe de nombreux sites de phosphorylation de MAP2 (Sánchez, Díaz-Nido, and Avila 2000). Et il a été montré qu'une phosphorylation de son domaine de fixation aux microtubules provoque une baisse de son action positive sur la polymérisation (Hoshi et al. 1988). De plus, la phosphorylation de MAP2 est associée à une diminution de la polymérisation et une plus grande dynamique des microtubules (Yamamoto et al. 1983; Hoshi et al. 1988; Illenberger et al. 1996).

I.3.1.3. Modifications post-traductionnelles de la tubuline α

Il existe différentes modifications post-traductionnelles des tubulines α et β : la polyglutamylation (Eddé et al. 1990), la polyglycylation (Redeker et al. 1994), la phosphorylation (Eipper 1972), la palmitoylation (Caron 1997), la détyrosination, la tyrosination (Barra et al. 1974) et l'acétylation (L'Hernault and Rosenbaum 1983).

Le cycle de détyrosination/tyrosination ainsi que l'acétylation sur la lysine 40 de la tubuline α sont associés à la dynamique des microtubules et peuvent servir de marqueur car il a été mis au point, pour chacune de ces modifications, des anticorps spécifiques.

La tyrosine est le dernier acide aminé de l'extrémité C-terminale de la tubuline α après sa traduction : on parle alors de tubuline α tyrosinée (Tyr-Tub). Cette tyrosine terminale peut être clivée grâce à l'action d'une carboxypeptidase et l'acide aminé terminal de la protéine est alors un acide glutamique : on parle de tubuline α détyrosinée (Glu-Tub) (*Figure I.5.*).



La carboxypeptidase responsable de cette modification « post-traductionnelle » n'est à ce jour pas identifiée, même si il est connu qu'elle agit préférentiellement sur des microtubules polymérisés. A contrario, l'enzyme qui permet de lier une nouvelle tyrosine à la tubuline détyrosinée est, elle, identifiée : il s'agit de la tubuline-tyrosine-ligase (TTL). Elle n'est capable d'agir que sur des tubulines libres non polymérisées. Ainsi, ce phénomène constitue un cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline α (voir *Figure I.5.*).

La tubuline α peut également être acétylée sur la lysine située en 40ème position. Cette autre modification post-traductionnelle s'effectue grâce à l'acétyltransférase MEC17 récemment découverte et renommée α -tubulin N-acetyltransférase 1 (α TAT1) (Akella et al. 2010; Shida et al. 2010; Davenport et al. 2014). La déacétylation peut également avoir lieu et les deux enzymes mises en cause jusqu'à présent, HDAC6 (Matsuyama et al. 2002; Hubbert et al. 2002) et SIRT2 (North et al. 2003) sont des homologues d'histones déacétyltransférases (HDAC). Contrairement aux modifications de la partie C-terminale de la tubuline α qui apparaissent à la surface du microtubule, l'acétylation de la lysine 40 s'effectue dans la lumière du microtubule.

I.3.2. Modifications post-traductionnelles et dynamique des microtubules

Immédiatement après la traduction, la tubuline α possède une tyrosine à son extrémité C-terminale et n'est pas acétylée. Les modifications post-traductionnelles de types dé-tyrosination ou acétylation surviennent sur des microtubules déjà formés et sont donc liées à « l'âge » du microtubule dans la cellule.

En effet, α TAT1, étant donné sa faible vitesse d'action, n'agit que sur des microtubules d'un certain âge et donc, stables (Szyk et al. 2014). De plus, HDAC6, responsable de la dé-acétylation de la tubuline, joue un rôle dans la dynamique des microtubules *in vitro* (Matsuyama et al. 2002).

Enfin, il a été montré que les microtubules possédant des tubulines α détyrosinées ou acétylés avaient un turnover plus lent (Webster et al. 1987; Webster and Borisy 1989) et étaient plus résistants à différents agents dépolymérisants comme le nocodazole (Khawaja, Gundersen, and Bulinski 1988). Cependant, ce lien entre modifications post-traductionnelles et stabilité microtubulaire ne semble pas être direct (Khawaja, Gundersen, and Bulinski 1988). Il est lié à la régulation par les modifications post-traductionnelles de facteurs de dynamique

microtubulaire comme la kinase MCAK pour « centromere-associated Kinesin », par exemple. En effet, cette kinase, *in vitro*, dépolymérise préférentiellement les microtubules composés de tubulines tyrosinées (Peris et al. 2009). De même, des protéines associées aux microtubules interagissent avec l'extrémité « + » et jouent ainsi un rôle dans la régulation de la stabilité microtubulaire. Ces protéines telles que les CAP-Gly pour « cytoskeleton-associated protein glycine-rich) se fixent préférentiellement aux polymères riches en tubulines α tyrosinées plutôt que détyrosinées (Peris et al. 2006).

I.3.3. Microtubules dans le système nerveux central

Les microtubules constituent des faisceaux parallèles dans les axones et les dendrites. Dans les axones, ils sont généralement tous orientés dans le même sens : l'extrémité (+) orientée vers l'extrémité de l'axone et l'extrémité (-) orientée vers le soma. Cela n'est pas le cas dans les dendrites où ils peuvent être orientés dans les deux sens (Hoogenraad and Bradke 2009).

De plus, il a été observé dans des axones de neurones sympathiques en culture, deux types différents de polymères de microtubules. Il a été observé qu'une partie (48 %) des polymères issus des microtubules axonaux était sensible au nocodazole avec un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de 5 min, tandis que l'autre partie était plus résistante avec un $t_{1/2}$ de 240 min. La première partie, labile, se trouvait du côté de l'extrémité (+) sur les mêmes microtubules que la seconde partie, plus stable, du côté de l'extrémité (-). Alors que la partie labile était riche en tubulines α tyrosinées, la partie stable était plus riche en tubulines α détyrosinées et acétylées. La séparation entre ces deux parties était abrupte et semblait révéler deux étapes distinctes dans la formation du microtubule (Baas and Black 1990; A. Brown et al. 1993). Enfin, le *turnover* de tubulines était plus important dans la partie des microtubules la plus riche en tubulines α tyrosinées, ce qui confirme l'idée qu'il existe une plus grande dynamique chez ces polymères (Y. Li and Black 1996). Beaucoup d'études concernant la dynamique

microtubulaire ont porté sur l'axone. Il a été montré que les microtubules et plus particulièrement leur dynamique (révélée par la présence d'une grande proportion de tubulines α tyrosinées) était nécessaire à la croissance de l'axone (Rochlin, Wickline, and Bridgman 1996). De plus, il a été montré que la proportion de tubulines α tyrosinées dans l'axone était plus importante au niveau du cône de croissance et au niveau proximal. Cela signifie qu'une plus grande dynamique a lieu à ces deux niveaux de l'axone (A. Brown, Slaughter, and Black 1992).

I.3.4. Implication de la dynamique microtubulaire dans la physiopathologie de la depression

Récemment, une baisse de l'expression du gène d'une protéine associée aux microtubules, la MAP1A a été observée dans l'hippocampe de patients dépressifs s'étant suicidés. Cette altération était accompagnée par une baisse des ARNm de récepteurs glutamatergiques et de protéines synaptiques (Duric et al. 2013) suggérant un lien entre les altérations microtubulaires et des altérations synaptiques. De plus, chez la souris, la délétion génétique de la MAP appelée STOP (Stable Tubule Only Polypeptide) ou MAP6 montre un comportement de type dépressif (« depression-like »), accompagné d'une altération des tonus sérotoninergique et noradrénergique (Fournet, Schweitzer, et al. 2012). Chez l'Homme, ce gène a été impliqué également dans des troubles psychiatriques comme la schizophrénie (Shimizu et al. 2006). De plus, un traitement avec l'épothilone D, une molécule stabilisant le système microtubulaire en se fixant sur la partie N-terminale de la tubuline β , permet de récupérer le déficit de mémoire à court-terme observé chez ces souris mutantes, suggérant une implication du système microtubulaire non pas seulement dans l'étiologie de la pathologie, mais aussi dans son traitement (Fournet, de Lavilléon, et al. 2012).

De plus, il a été montré des variations de la dynamique microtubulaire dans des modèles animaux de troubles dépressifs. Tout d'abord, dans un modèle d'isolement social de quatre

semaines, après le sevrage, chez le rat, une diminution du ratio de tubulines α tyrosinées sur les tubulines α détyrosinée (ratio : Tyr/Glu-Tub) a été mise en évidence dans l'hippocampe, suggérant une baisse de la dynamique microtubulaire dans cette région. Cette altération était accompagnée d'une diminution de l'expression de MAP2 observée par Western blot (M. Bianchi et al. 2006) signifiant un éventuel lien entre augmentation de la stabilisation des microtubules et diminution de l'expression de MAP2 et évoquant une potentielle réponse adaptatrice de la cellule. De même, une autre étude portant sur un isolement social opéré sur une plus longue période (huit semaines) montre également une diminution du ratio Tyr/Glu-Tub mais aussi une diminution de la tubuline α acétylée dans l'hippocampe (Massimiliano Bianchi, Shah, et al. 2009). De plus, dans un modèle de stress chronique modéré imprédictible chez le rat, il a été observé, également diminution du ratio Tyr/Glu-Tub et augmentation de la tubuline α acétylée accompagnées par une diminution de la phosphorylation de la MAP2 (Yang et al. 2009). Ces résultats évoquant une réponse au stress à plus long terme impliquant non seulement le cycle de tyrosination/détyrosination, mais aussi l'acétylation de la tubuline α .

Enfin, il a été montré qu'un traitement chronique à la fluoxétine sur des rats naïfs diminue la proportion de tubulines α acétylées dans l'hippocampe, ce qui fut interprété comme une augmentation de la proportion de microtubules plus dynamiques (Massimiliano Bianchi, Shah, et al. 2009). En revanche, dans le modèle d'isolement social, le traitement chronique à la fluoxétine ne fait pas varier la tubuline α acétylée, mais augmente le ratio Tyr/Glu-Tub (Massimiliano Bianchi, Fone, et al. 2009). Cela suggère que le traitement avec un ISRS agit sur la dynamique des microtubules dans l'hippocampe différemment si les rats sont naïfs ou s'ils sont chroniquement stressés. Cependant, un traitement chronique par un antidépresseur semble toujours aller dans le sens d'une augmentation de la dynamique microtubulaire.

I.4. MODÈLES ANIMAUX DE DÉPRESSION

I.4.1. Modèles animaux des troubles dépressifs

Les événements stressants survenant au cours de la vie (*voir paragraphe I.1.2.3.1*) ainsi que l'hérédité (*paragraphe I.1.2.2*) sont les principaux facteurs associés à la survenue des troubles dépressifs chez l'Homme (Kendler, Karkowski, and Prescott 1999). Ainsi, les modèles animaux les plus utilisés sont ceux qui consistent en une exposition chronique des animaux à un stress. Les espèces animales les plus courantes en laboratoire sont des rongeurs. Ces espèces réagissent fortement à la contention, à l'isolement social ou au stress psychosocial. Il est possible de varier chaque jour le type de stress auquel l'animal sera soumis, c'est le principe du « chronic unpredictable mild stress » ou CUMS (*pour revue*, (O'Neil and Moore 2003). Cependant, un des modèles les plus pertinents est le stress psychosocial chronique (Blanchard et al. 1993). En effet, plusieurs études ont montré que ce type d'éléments stressants étaient très présents dans la vie des patients (Blanchard et al. 1993).

De plus, la manipulation d'un gène peut rendre un animal plus ou moins sensible aux événements de son environnement. Il est donc possible de créer des modèles mécanistiques (Touma et al. 2008). Dans ces modèles axés sur une modification génétique, on peut intervenir sur l'axe HHS *in vivo*, par exemple, en faisant en sorte que des souris sous-expriment le gène des récepteurs GR (Massart, Mongeau, and Lanfumey 2012).

Enfin, la sensibilité innée au stress est un facteur important interférant sur le déclenchement de la maladie chez l'Homme (Bale 2006). Il existe des modèles animaux dits « spontanés » montrant un phénotype de type anxiodépressif de manière héréditaire tels que la lignée de rat FSL pour « Flinders Sensitive Line ». Ces animaux auraient la sensibilité innée au stress plus importante, les rendant plus sensibles aux tests qui mettent en évidence un comportement de type « dépressif » ou de type « anxieux ».

I.4.2. Stress psychosocial chronique chez le toupaye de Belanger

I.4.2.1. Toupaye de Belanger



Le toupaye est phylogénétiquement plus proche de l'Homme que le rongeur. Cependant, le premier écrit évoquant l'existence de cet animal datant de 1780 le situe plus proche de l'écureuil que des primates. Cet amalgame a persisté longtemps. Pourtant, en 1924, Le Gros Clark note le rapprochement entre les toupayes et les primates. Ses conclusions étaient alors basées sur l'anatomie cérébrale de l'animal. Mais ce n'est que très récemment que le toupaye a cessé d'être considéré comme un rongeur et a été classé dans son propre ordre, les Scadentia, se situant avec les primates et les dermoptères dans le clade des euarchontes (Tuttle 1991; Novacek 1992; Kriegs et al. 2007).

Les différentes espèces de toupayes vivent dans les forêts de Malaisie et d'Asie du Sud-Est. Le toupaye de Belanger (*Tupaia belangeri*) est un petit mammifère omnivore qui pèse entre 50 et 300 g, vit dans les arbres mais niche au sol. Le mâle est territorial (un hectare de forêt) et n'accepte qu'une femelle ainsi que sa progéniture en bas âge (Kawamichi and Kawamichi 1979). De plus, il marque son territoire avec son urine, les sécrétions de diverses glandes et sa salive (Eberhard Fuchs and Corbach-Söhle 2010). De façon intéressante, ce comportement se retrouve en laboratoire.

Les rythmes circadiens notamment celui de la température corporelle de ce mammifère ont été récemment observés par télémétrie (Coolen et al. 2012). Les variations de température corporelle atteignent 3 à 4 °C entre la valeur la plus haute (le jour) et la valeur la plus basse (la nuit). Le toupaye de Belanger est un animal diurne qui possède des cycles de sommeil similaires à ceux de l'Homme. D'ailleurs, lors d'une privation de sommeil chez le toupaye, il a été montré une réponse similaire à celle observée chez l'Homme, à savoir qu'une plus

grande quantité de sommeil et, en particulier, de sommeil NREM succède à la privation (Coolen et al. 2012).

De plus, tout comme les primates, le toupaye produit du cortisol, en quantité mesurable dans le sang, dans la salive et dans l'urine et dont la concentration augmente de façon significative lors d'un stress (F. Ohl, Kirschbaum, and Fuchs 1999; Frauke Ohl and Fuchs 1999). Il a même été mesuré chez ces animaux une diminution du volume hippocampique lors d'administration chronique de cortisol (F. Ohl, Kirschbaum, and Fuchs 1999; Frauke Ohl and Fuchs 1999).

I.4.2.2. Le stress psychosocial chronique chez le toupaye - un modèle de dépression

Le toupaye de Belanger est utilisé en laboratoire depuis les années 1980 pour son comportement territorial et pour les effets des relations dominant/subordonné sur sa physiologie. Cependant, c'est plus récemment qu'un protocole de stress psychosocial chronique a été établi et validé pour modéliser les troubles dépressifs (Eberhard Fuchs and Flügge 2002; Kampen et al. 2002; Eberhard Fuchs 2005).

L'exposition à un stress psychosocial chez certains animaux comme le toupaye de Belanger constitue une modélisation d'un stress social chez l'Homme, facteur avéré pour le déclenchement de troubles dépressifs (Kendler, Karkowski, and Prescott 1999). Ainsi, le stress psychosocial chronique chez le toupaye de Belanger consiste à mettre en contact deux mâles durant quatre semaines ou plus (*voir Paragraphe II.4.1 pour les détails méthodologiques ; Fuchs, 2005*). Une relation dominant/subordonné s'instaure très rapidement et perdure de façon stable. Les animaux subordonnés perdent du poids et subissent une réduction drastique de leur activité locomotrice (Kampen et al. 2002). De plus, ils développent un comportement d'évitement du congénère dominant ainsi qu'une anhédonie (Wang et al. 2013). Leur rythme circadien et leur sommeil sont également perturbés

(Eberhard Fuchs 2005; Kampen et al. 2002). De plus, il est observé une diminution de l'activité gonadique (Fischer, Heinzeller, and Raab 1985; M. Kramer, Hiemke, and Fuchs 1999) et une hyperthermie (Kohlhause et al. 2011). Ces animaux montrent également une augmentation de l'activité du système sympathique (E Fuchs, Jöhren, and Flügge 1993) et de l'activité de l'axe HHS (Kozicz et al. 2008; F. Ohl, Kirschbaum, and Fuchs 1999) ainsi qu'une diminution des ARNm des récepteurs GR dans l'hippocampe (Jöhren, Flügge, and Fuchs 1994; Meyer et al. 2001) montrant une sensibilité particulière de l'hippocampe à la chronicité du stress.

De façon très intéressante, l'exposition au stress psychosocial induit des modifications structurales dans l'hippocampe, telles qu'une diminution du volume général de l'hippocampe (Czeh et al. 2001; F Ohl et al. 2000), une atrophie des épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'aire CA3 (Magariños et al. 1996) ainsi qu'une diminution de la plasticité astrogliale (Czeh et al. 2005) et synaptique (E Fuchs et al. 2002). Ces anomalies neuroanatomiques miment ainsi les anomalies observées chez les patients dépressifs, (*voir paragraphe I.1.3.3.2*), ce qui rend ce modèle particulièrement pertinent.

De plus, de nombreux antidépresseurs ont déjà été testés sur ce modèle. Le premier antidépresseur testé fut un ATC, la clomipramine (Eberhard Fuchs et al. 1996). Les animaux traités ont montré une restitution de leur activité locomotrice et une diminution du comportement d'évitement. Son efficacité a été récemment confirmée par une autre équipe (Wang et al. 2013) puisque la clomipramine est également capable d'annihiler l'anhédonie (appétance au sucrose) observée dans ce modèle. Cependant la clomipramine augmente la perte de poids observée et ne prévient pas systématiquement l'augmentation du taux de cortisol urinaire induite par le stress (Eberhard Fuchs et al. 1996). Par la suite, l'utilisation de la tianeptine a produit d'autres résultats. Cette molécule a en effet permis une récupération de

la prolifération cellulaire dans le gyrus denté ainsi que de la diminution du volume de l'hippocampe (E Fuchs et al. 2002).

La fluoxétine administrée au long cours chez les toupayes exposés au stress psychosocial a également induit des effets positifs en récupérant le volume de l'hippocampe, ou encore la perte de cellules astrogliales. Cependant, elle ne permet pas de retrouver le volume basal des glandes adrénales qui est augmenté par le stress chronique, ni de récupérer le taux plasmatique basal de testostérone ou le poids des testicules qui sont diminués (Czéh et al. 2005). Comme la fluoxétine, l'agomelatine montre, dans ce modèle, un effet récupérateur sur le taux plasmatique de cortisol et de noradrénaline (Schmelting et al. 2014a). De plus, elle permet une réduction de l'hyperthermie nocturne induite par le stress.

En conclusion, ce modèle est l'un des plus pertinents modèles mimant les troubles dépressifs de par sa validité de construction, d'apparence et de prédiction. En effet, il est construit grâce à des facteurs de stress connus pour déclencher la maladie chez l'Homme (validité de construction). De plus, on observe des phénomènes similaires à ceux qui sont observés chez l'Homme (validité d'apparence). Enfin, les antidépresseurs agissent sur ce modèle (validité de prédiction). Il est utilisé pour mieux comprendre les phénomènes neurobiologiques et physiologiques impliqués dans les troubles dépressifs ainsi que pour valider des molécules innovantes ayant une potentielle efficacité antidépressive (van der Hart et al. 2005; Michael-Titus et al. 2008).

I.4.3. Lignée de rats Wistar Kyoto

La souche de rats Wistar Kyoto (WKY) est issue d'une sélection à partir de rats Wistar. Elle affiche plusieurs comportements proches des symptômes retrouvés chez les dépressifs tels qu'une activité locomotrice réduite, une immobilité augmentée dans le test de nage forcée (W. P. Paré 1989), un comportement passif face au danger rapidement acquis (William P. Paré

1993). De plus, cette souche de rats montre un taux d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) plasmatique particulièrement élevé suite à un stress (W. P. Paré and Redei 1993). Ces rats sont donc considérés comme animaux ayant une réponse exagérée au stress.

Cette lignée était utilisée, à l'origine, comme une souche contrôle de rats normotendus par rapport aux rats hypertendus de souche SHR (*Spontaneously hypertensive rats*). Par la suite, il fut observé la présence plus importante d'ulcère lié au stress chez ces animaux par rapport aux rats SHR (W. P. Paré 1989). Il a été très rapidement observé un comportement hyper-anxieux des rats WKY dans le test de l'« *open-field* » et une déficience dans le comportement de fuite lors d'un test d'impuissance apprise (William P. Paré 1993). En effet, le comportement de « *freezing* » dans la boîte de Skinner et les faibles déplacements dans « *l'open-field* » suggèrent des comportements anxieux. Enfin, l'immobilité accrue lors du test de nage forcée fait des rats WKY un modèle approprié pour les troubles dépressifs, lorsqu'ils sont comparés aux autres lignées de rats. Sur ce modèle, la désipramine réduit l'immobilité lors du test de nage forcée (Tejani-Butt, Kluczynski, and Paré 2003). En revanche, il apparaît que cette lignée est résistante aux ISRS tels que la fluoxétine (Griebel et al. 1999). Ce modèle est donc un modèle de résistance à certains antidépresseurs classiquement utilisés.

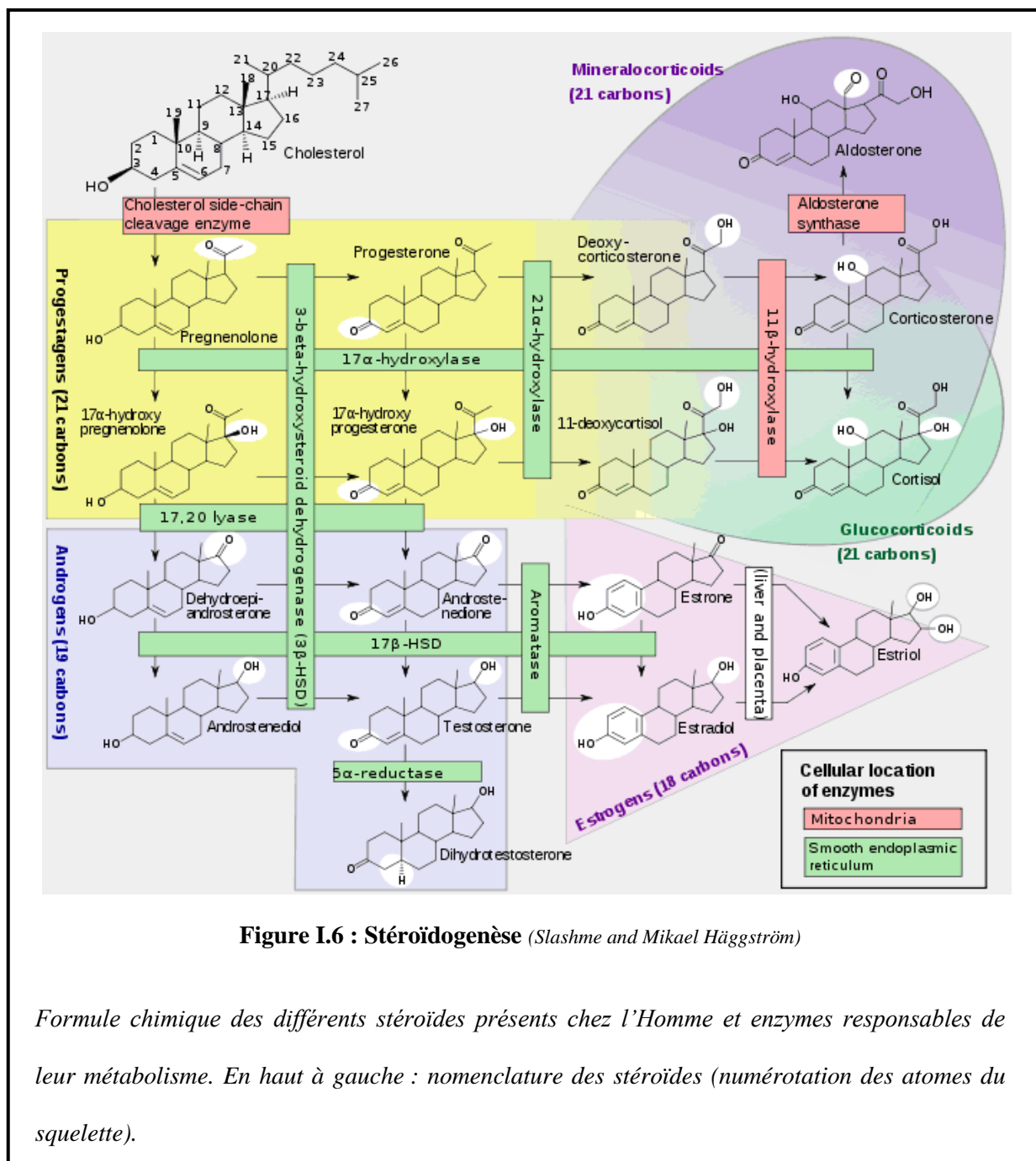
I.5. NEUROSTÉROÏDES : DÉFINITION ET MODE D'ACTION

I.5.1. Neurostéroïdes

Selye, au début des années 1940, établit un lien fonctionnel entre hormones stéroïdes et système nerveux central. En effet, il constate l'effet presque immédiat d'une injection intra-péritonéale de progestérone sur le système nerveux central de rats. Plus particulièrement, il observe un effet relativement rapide anesthésique et anticonvulsant du stéroïde (Selye 1941). Or, cela va à l'encontre du mode d'action génomique des stéroïdes qui demande beaucoup plus de temps. Il suggère alors que ce phénomène pourrait avoir un rôle, par exemple, dans les

problèmes de somnolence lors de la grossesse chez la femme enceinte, dans les tensions prémenstruelles et dans d'autres conditions cliniques où la production d'hormones stéroïdes est augmentée (Selye 1956).

Puis, c'est dans les années 1980 que le professeur Etienne Emile Baulieu définit le concept de neurostéroïdes. « *Les neurostéroïdes sont synthétisés dans le système nerveux central et*



périphérique, particulièrement dans les cellules gliales myélinisantes, à partir du cholestérol ou de précurseurs stéroïdiens importés d'une source périphérique. Ils incluent les composés 3 bêta-hydroxy-delta 5, comme la prégnénolone (PREG) et la déhydroépiandrostérone (DHEA), leur sulfates et leur métabolites réduits comme le tétrahydrodérivé de progestérone : 3 alpha-hydroxy-5 alpha-prégnane-20-one (3 alpha,5 alpha-THPROG). Ces molécules peuvent agir comme modulateur allostérique des récepteurs aux neurotransmetteurs comme le GABA_A ou le NMDA, et les récepteurs sigma. » (Baulieu 1997).

De plus, en 1991 Purdy découvre qu'un stress aigu provoque, chez le rat surrénalectomisé, une augmentation de la concentration plasmatique et cérébrale de deux métabolites de la progestérone : l'allopregnanolone (3 α ,5 α -THP) et l'allotétrahydroDOC (3 α ,5 α -THDOC), qui sont susceptibles d'activer les récepteurs du GABA (Purdy et al. 1991).

I.5.2. Neurostéroïdes et troubles dépressifs

Les neurostéroïdes, de par leur action neuromodulatrice centrale et/ou périphérique, sont connus depuis longtemps pour avoir un rôle dans les troubles de l'humeur. Il a été montré, en particulier, leur implication dans les troubles de l'humeur postpartum chez la femme (Schiller, Schmidt, and Rubinow 2014) et leur action sur les récepteurs GABA a été mise en cause (Amin et al. 2006).

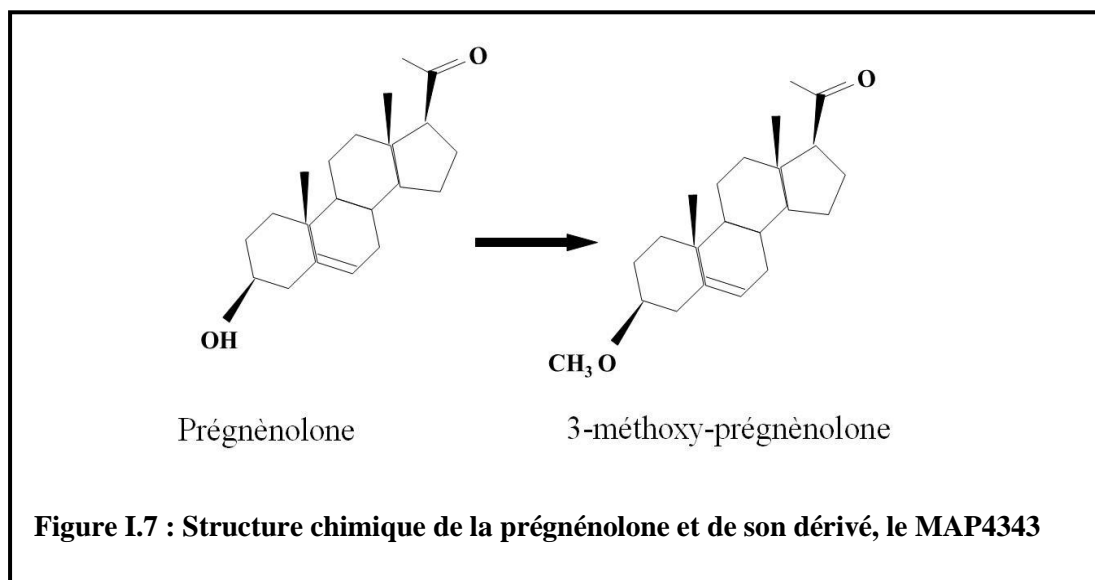
La concentration d'allopregnanolone, dérivé de progestérone, dans le plasma et le fluide cébrospinal de patients déprimés est plus faible que chez des individus témoins (Romeo et al. 1998; Veska Uzunova, Sampson, and Uzunov 2006). De plus, des études ont montré une relation inverse entre ces concentrations d'allopregnanolone et la sévérité du trouble dépressif (V. Uzunova et al. 1998) ainsi qu'une relation directe entre l'efficacité du traitement et la concentration d'allopregnanolone (Romeo et al. 1998; V. Uzunova et al. 1998; Ströhle et al. 1999; Ströhle et al. 2000).

De plus, il a été montré un effet antidépresseur de l'alloprégnanolone dans des modèles animaux (Khisti and Chopde 2000). En effet, l'administration de neurostéroïdes a montré des effets notables sur le comportement de type anxieux et « dépressif » de rongeurs. L'administration de progestérone (1.0 mg, s.c.) entraîne une diminution du temps d'immobilité et une augmentation de la latence avant immobilité dans le test de nage forcée chez la souris sauvage (Frye et al. 2004). Cet effet serait dépendant de la métabolisation de la progestérone. En effet, chez des souris *knock-out* pour la 5 α -réductase, la progestérone n'a pas d'effet (Frye et al. 2004).

Chez l'Homme une certaine efficacité d'un traitement avec de la prégnénolone a été montrée chez des patients atteints de schizophrénie (C. E. Marx et al. 2011; M. S. Ritsner 2011). En effet, le traitement à base de prégnénolone (50 mg par jour) permet de réduire les symptômes positifs de la maladie (Christine E. Marx et al. 2009; Michael S. Ritsner, Bawakny, and Kreinin 2014). Enfin, très récemment, la prégnénolone a été testée sur la phase dépressive de patients atteints de troubles bipolaires dans une étude de type « add-on », au cours de laquelle les patients conservent leur traitement en cours (E. S. Brown et al. 2014). Non seulement la prégnénolone a été bien tolérée, mais elle a montré une meilleure efficacité antidépressive que le placebo. Ces résultats suggèrent que la prégnénolone et ces dérivés possèdent une réelle efficacité antidépressive.

I.5.3. Le MAP4343

Le 3 β -méthoxyprégnénolone (MAP4343) développé par la société Mapreg SAS est un dérivé synthétique non métabolisable de la prégnénolone (*Figure I.7.*). En effet, il a été montré que la [3 H]pregnéolone a la capacité de se lier à la protéine associée aux microtubules de type 2, MAP2 (Murakami et al. 2000) et que le MAP4343 permettait un déplacement total de cette liaison (données non-publiées, voir Thèse de doctorat de (Fontaine-Lenoir and Baulieu 2006).



Par la suite, un site de fixation de la prégnénolone sur MAP2C a été identifié en partie N-terminale (Fontaine-Lenoir et al. 2006; Mizota and Ueda 2008). *In vitro*, il a été montré que le MAP4343 a un effet sur la polymérisation des microtubules isolés de rats, ce qui renforce l'idée d'une action directe sur le système microtubulaire. De plus, il agit sur la croissance neuritique de la lignée cellulaire PC12 (après traitement au facteur de croissance, NGF, ou « *nerve growth factor* ») de façon MAP2-dépendante (Fontaine-Lenoir et al. 2006). Enfin, le MAP4343 a un effet protecteur sur la rétraction neuritique induite par le nocodazole sur les cellules PC12 en culture (Fontaine-Lenoir et al. 2006). En effet, le nocodazole dépolymérise les microtubules via sa liaison à la tubuline β . Cet effet protecteur du MAP4343 implique sa liaison à MAP2 puisque la diminution de l'expression de MAP2 induite par l'introduction d'ARN interférents inhibe l'effet protecteur du MAP4343.

La fixation du MAP4343 sur les récepteurs de divers neurotransmetteurs et en particulier sur les récepteurs monoaminergiques ou GABAergiques a bien évidemment été testée et s'est révélée non significative (données non publiées).

Le MAP4343 a montré chez l'animal, une efficacité de type antidépressive similaire à la fluoxétine, voire meilleure (M. Bianchi and Baulieu 2012). L'hypothèse était que l'action du

MAP4343 sur les microtubules de certaines régions cérébrales impliquées dans la pathologie de la dépression comme l'hippocampe, pourrait avoir une répercussion bénéfique sur la physiologie et le comportement des animaux. Tout d'abord, il a été observé après une injection aiguë chez le rat Sprague Dawley, une augmentation de la dynamique microtubulaire dans l'hippocampe et une diminution de l'immobilité dans le test de nage forcée, contrairement à la fluoxétine. Ensuite, dans un modèle animal de dépression, l'isolement social après le sevrage chez le rat, l'injection de MAP4343 montre une efficacité dans le test de nage forcée (diminution de l'immobilité) plus rapide que la fluoxétine. Par ailleurs, dans l'hippocampe, il semblerait que la molécule permette de récupérer les altérations de la tubuline α observée chez les rats isolés. En particulier, elle inhibe la diminution du ratio Tyr/Glu-Tub et l'augmentation de l'Acet-Tub, ce qui n'est pas le cas avec la fluoxétine.

I.6. OBJECTIFS

Le but de ce travail de thèse était de tester l'effet de type antidépresseur du MAP4343 sur deux nouveaux modèles pré-cliniques permettant de compléter les résultats encourageants obtenus précédemment. En effet, les antidépresseurs classiquement utilisés manquent d'efficacité et engendrent de nombreux effets secondaires. Le MAP4343 est innovant de par son mode d'action (non-monoaminergique). Ces deux nouveaux modèles animaux utilisés avec deux voies d'administration différentes de la molécule (sous-cutané et *per os*) ont permis de préciser l'efficacité et le mode d'action du MAP4343.

Ainsi, la première étude avait pour but de se rapprocher le plus possible d'un traitement chez le patient humain. Pour cela, le toupaye de Belanger a été choisi puisque cette espèce est plus proche de l'Homme que le rongeur. De plus, le stress psychosocial chronique est un des premiers facteurs environnementaux incriminés chez l'Homme. Enfin, il a été choisi une administration orale du MAP4343 pour se rapprocher le plus des conditions d'administration

chez les patients. Afin de vérifier son efficacité prolongée, la molécule a été administrée sur une plus longue période (4 semaines) que lors de la précédente étude. Dans ce modèle, nous avons suivi quotidiennement la physiologie générale des animaux (poids, température corporelle). De même, le comportement (l'activité locomotrice et le comportement d'évitement) ainsi que le sommeil des animaux sont monitorés dans le but d'observer un isomorphisme avec les symptômes humains de la maladie. Mais nous avons également observé l'axe HHS et le système sympathique incriminés dans la pathologie via les hormones urinaires (cortisol, noradrénaline).

En revanche, la seconde étude a eu pour but de confronter l'efficacité du MAP4343 à la diversité des modèles de troubles dépressifs existants. En effet, étant donnée la multitude et la complexité des facteurs connus favorisant l'apparition de troubles de l'humeur, il est important de tester la molécule sur des modèles variés. Les modèles spontanés, comme la lignée de rat Wistar Kyoto, s'opposent aux modèles induits comme le modèle de stress psychosocial chronique. Pour cette deuxième étude, le MAP4343 a été administré une heure trente avant chacun des trois tests de comportement ce qui permet d'évaluer son effet aigu sur l'activité locomotrice (dans l'*open field*), le comportement de type anxieux (dans labyrinthe en croix surélevé) et l'état dit « de désespoir » (dans test de nage forcée) (Porsolt, Bertin, and Jalfre 1977; Cryan and Holmes 2005). Dans cette étude, le protocole, plus simple nous a permis de comparer les résultats obtenus avec notre molécule à ceux obtenus avec un antidépresseur classique tel que la fluoxétine.

Enfin, le système microtubulaire, cible pottentiel du MAP4343, a été examiné dans les deux études grâce à la quantification par Western-blot des proportions respectives des différentes modifications post-traductionnelles de la tubuline α , dans l'hippocampe, ainsi que de la

phosphorylation de MAP2, cible du MAP4343. En effet, l'hippocampe est directement impliqué dans la pathologie.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. ANIMAUX

II.1.1. Toupayes de Belanger (*Toupaia belangeri*)

Les animaux utilisés étaient des toupayes de Belanger (*Toupaia belangeri*), mâles, adultes (durée de vie 10 ans), âgés de 1 à 2 ans (400-800 g) de la colonie de reproduction du German Primate Center (Göttingen, Allemagne). Ils étaient hébergés individuellement dès la puberté dans des cages en acier dont les dimensions réglementaires sont de 80 × 50 × 125 cm (L x l x h). Chaque cage contenait un nichoir au sol de 18 × 15 × 15 cm (L x l x h) et un système de branches d'arbre à différents niveaux. Les phases d'éclairage étaient de 12h, de 08h00 à 20h00 (200 lux) avec 60 ± 7% d'humidité et une température ambiante de 27 ± 1°C (*pour les détails voir* (Eberhard Fuchs and Corbach-Söhle 2010). Les animaux ont eu un accès illimité à l'eau et à la nourriture (Altromin, Lage, Germany).

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la directive du Conseil de la Communauté européenne de septembre 2010 (2010/63/EU) et approuvées par le Lower Saxony Federal State Office for Consumer Protection and Food Safety, Allemagne.

II.1.2. Rats Wistar Kyoto

Pour cette étude, des rats mâles Wistar (WI) et Wistar Kyoto (WKY) âgés de 7 semaines ont été fournis par l'élevage « Harlan Laboratories ». Ils ont tous été hébergés dans la même pièce, groupés par 3 ou par 4 par cage, en conditions contrôlées (21±1°C, éclairage de 7h00 à 19h00, nourriture et eau disponibles *ad libitum*). Le déroulement des expériences était en accord avec la directive du Conseil de la Communauté européenne (86/609/EEC) et approuvé par le comité scientifique interne de MAPREG et de l'unité mixte de recherche U788 - INSERM.

II.2. PRÉPARATION ET ADMINISTRATION DU MAP4343

II.2.1. Administration orale pour le toupaye de Belanger

Le MAP4343 était dissous dans l'hydroxyéthylcellulose (HEC) par sonication (BransonTM Sonifer-450) puis administré par voie orale entre 8h00 et 8h30 du matin chaque jour de la période de traitement (*voir la Figure II-1*). Les animaux traités au MAP4343 ont reçu une dose de 50 mg/kg/jour (*per os*) alors que les animaux contrôles ont reçu l'HEC seule (véhicule).

II.2.2. Administration sous-cutanée des rats Wistar et Wistar Kyoto

Le MAP4343 était mélangé à l'huile de sésame et la solution était homogénéisée par sonication (BransonTM Sonifer-450), tandis que la fluoxétine (Biotrend, Germany) était dissoute dans une solution saline stérile injectable (NaCl 0,9%). Ces deux solutions étaient préparées quotidiennement. Le MAP4343 était administré par injection sous-cutanée à la dose de 10 mg /kg /jour et la fluoxétine par injection intrapéritonéale à la même dose. Les rats des différents groupes de traitement ont été distribués aléatoirement dans les cages dès leur arrivée.

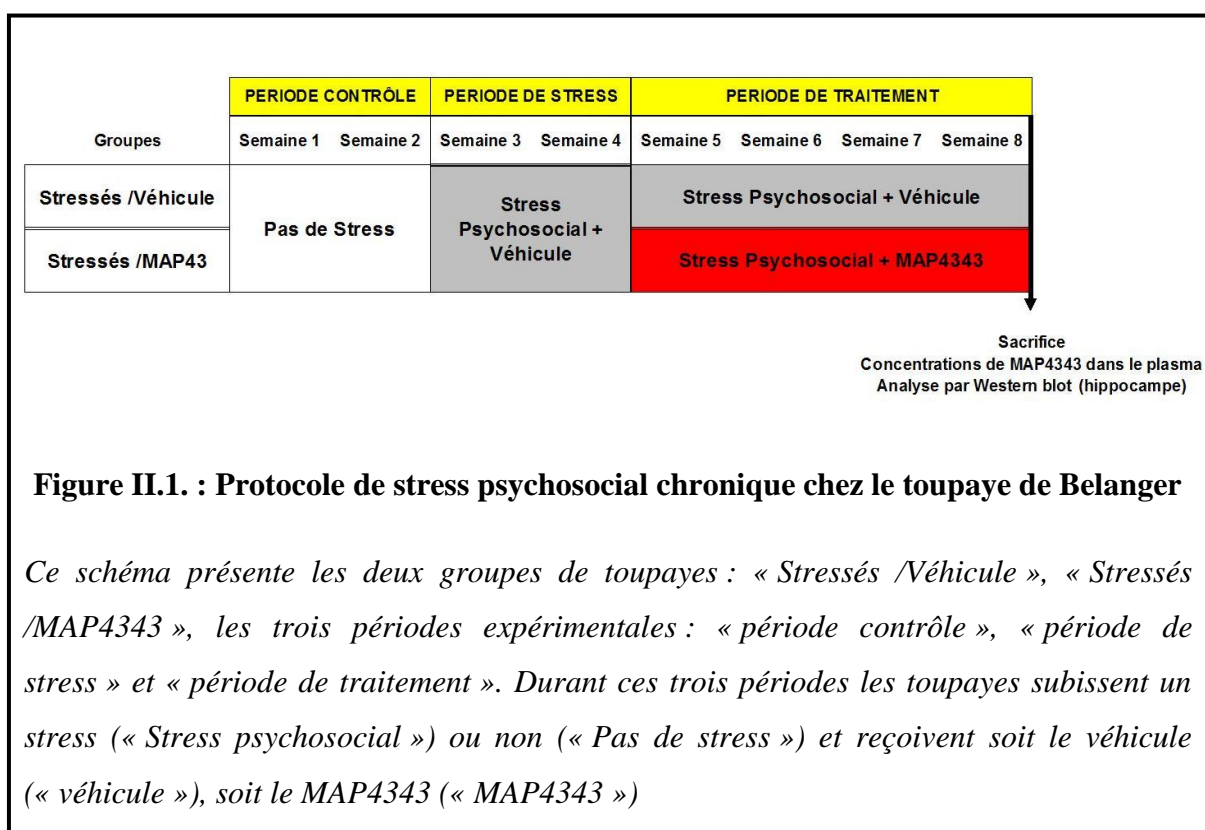
II.3. DOSAGE DE MAP4343 DANS LE PLASMA DES TOUPAYES

Immédiatement après décapitation, le sang du tronc a été récupéré, centrifugé à 4 °C et le plasma ainsi collecté a été conservé à 80 °C. La concentration plasmatique de MAP4343 a été mesurée par chromatographie liquide et spectrométrie de masse dans les laboratoires Bertin pharma (Orleans, France). Brièvement, après décongélation et centrifugation (5 min, 4000 rpm à 4 °C), 10 µl de solution de standard interne (prégnénolone acétate; 1 ng/ml) et 10 µl de méthanol sont mélangés au plasma (40 µl), puis de l'eau bidistillée est ensuite ajoutée pour obtenir un volume final de 760 µl. Les échantillons sont centrifugés (3 min; 4 000 rpm à 4 °C). L'extraction en phase solide (colonne Oasis HLB cartridges) a été précédée d'un rinçage (méthanol puis eau bi-distillée). Les échantillons ont été déposés dans la colonne.

Un premier rinçage a eu lieu avec de l'eau bidistillée, un second avec un mélange eau bidistillée /acétonitrile (8/2, V/V). Une élution finale avec du méthyl-tert-butyl éther (MTBE) a permis de collecter un produit. Cette phase éluée a été évaporée sous un flux d'azote à 40°C. Le résidu a été dissous dans une solution d'hydroxylamine (1,5 mol/l) et chauffé à 90 °C pendant 30 min. De l'eau bidistillée et du MTBE ont été ajoutés et les échantillons ont été agités 5 min et centrifugés (4000 rpm) pendant 5 min à 4 °C. La phase organique a été évaporée sous un flux d'azote à 40 °C. Le résidu a été dissous dans un mélange d'eau bidistillée/acétonitrile (15/85, V/V) et 0.1 % d'acide acétique. Après centrifugation (4000 rpm pendant 3 min à 4 °C), le mélange (5 µl) a été utilisé pour l'analyse chromatographique (XTerra MS C18, 2,1x100 mm, 5 µm; Waters, Guyancourt, France).

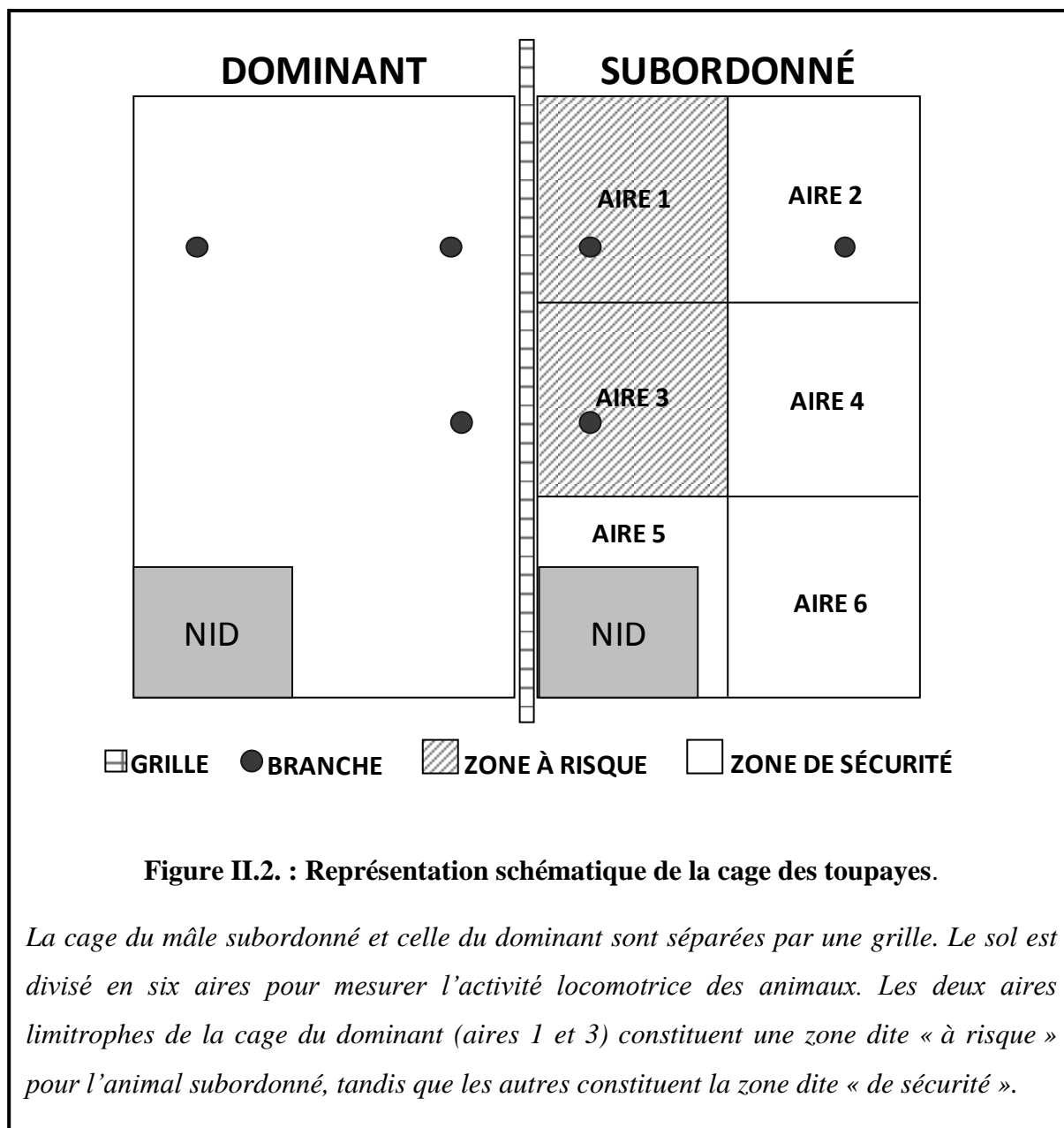
II.4. MODÈLE DE STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE

II.4.1. Protocole experimental



Deux groupes expérimentaux distincts ont été soumis à ce protocole de stress : un groupe d'animaux stressés recevant le véhicule (n = 8) et un groupe d'animaux stressés traités par le MAP4343 (n = 8). Le protocole de stress psychosocial chronique était constitué de trois périodes expérimentales distinctes comme décrit dans la figure II.1.

La première période expérimentale était une période contrôle de deux semaines (*semaines 1 et 2, Figure II.1.*) au cours de laquelle deux groupes d'animaux socialement naïfs ont été laissés dans leur cage sans qu'aucune manipulation ne soit pratiquée, à l'exception d'une administration *per os* d'HEC et d'un prélèvement urinaire, tous deux quotidiens.



Pendant les six semaines qui suivent cette période contrôle, le stress psychosocial a été appliqué aux deux groupes d'animaux. Ils ont continué de subir une administration quotidienne *per os* de véhicule, ainsi qu'un prélèvement urinaire chaque matin.

Le stress psychosocial consiste à introduire un animal socialement naïf (n'ayant pas eu de contact avec un autre mâle avant) dans la cage (« le territoire ») d'un autre animal socialement expérimenté. Les deux toupayes engagent alors une compétition pour leur territoire et s'établit une relation dominant/subordonné entre les deux sujets. A la fin de cette confrontation, une grille en métal permettant le contact visuel, olfactif et auditif sépare physiquement les deux animaux (*Figure II.2*). Elle est retirée une fois par jour pendant 1h, aléatoirement dans la journée, ce qui permet une nouvelle confrontation physique. C'est l'animal subordonné, considéré comme stressé, qui est utilisé pour l'expérience.

Durant les deux premières semaines de stress (*semaines 3 et 4, Fig. II.1.*), les deux groupes d'animaux n'ont reçu que du véhicule (HEC). Durant les quatre semaines suivantes (*semaines 5-8*), l'un des groupes a été traité quotidiennement avec du MAP4343 (50 mg/kg, *per os*), tandis que l'autre groupe a continué de recevoir uniquement le véhicule (*voir figure II.1*). Pendant toute la durée de la période expérimentale, les deux groupes d'animaux ont été filmés une heure par jour pour évaluer les paramètres comportementaux, tandis qu'un appareil télémétrique, préalablement implanté dans leur abdomen via une chirurgie des muscles abdominaux, a permis d'enregistrer en continu leur température corporelle (thermomètre) et leur électroencéphalogramme (*voir paragraphe II.4.4*). Chaque jour, le poids corporel des animaux des deux groupes expérimentaux a été relevé et des échantillons de leur urine ont été collectés en prévision de dosages des concentrations de cortisol et de noradrénaline. A la fin de la procédure, les deux groupes d'animaux ont été sacrifiés par décapitation. Le sang du tronc a été récupéré pour mesurer la concentration de MAP4343 plasmatique et les hippocampes ont

été disséqués et immédiatement congelés à - 80 °C, pour analyser ultérieurement l'expression des protéines microtubulaires par Western blot.

II.4.2. Mesures comportementales

Les mesures comportementales ont consisté à évaluer l'activité locomotrice d'une part, et le comportement d'évitement d'autre part. Pour réaliser ces mesures, les cages ont été séparées en six aires approximativement égales (*Figure II.2*). Les animaux ont été filmés dans leur propre cage, entre 16 h 30 et 17 h 30, (Kurre and Fuchs 1988). Les données ont été analysées par le logiciel EthoVision Pro 3.1 (Noldus, Wageningen, Pays-Bas).

II.4.2.1. Activité locomotrice

Les toupayes ont une activité locomotrice élevée durant la journée. Ils sautent de branche en branche dans leur cage (Eberhard Fuchs and Corbach-Söhle 2010). L'activité locomotrice de chaque animal subordonné a été évaluée pendant les différentes semaines expérimentales en mesurant le nombre de passages d'une aire à l'autre dans la cage (M. Kramer, Hiemke, and Fuchs 1999).

II.4.2.2. Comportement d'évitement

Une zone à risque est constituée des aires 1 et 3, voisines de la cage du mâle dominant, tandis que la zone de sécurité est constituée des aires 2, 4 et 6 (*voir Figure II.2*). L'évaluation du comportement d'évitement a été effectuée à l'aide de deux mesures, celle du nombre de passages dans les aires 1 et 3 et celle du temps total passé dans les aires 1 et 3.

II.4.3. Mesure du taux d'hormones urinaires

Les échantillons d'urine des deux groupes expérimentaux ont été collectés tous les matins au cours des trois périodes expérimentales avant que la lumière ne s'allume (Schmelting et al. 2014a). La miction a été induite par un massage hypogastrique. Les taux de noradrénaline urinaire ont été quantifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance après

extraction par colonne échangeuse d'ions BioRex 70 (BioRad, Munich, Allemagne). Les taux de cortisol libre urinaire, en revanche, ont été détectés grâce à un kit immunologique luminescent (IBL International, Hamburg, Allemagne). Pour compenser les variations physiologiques de la dilution urinaire, les taux d'hormones ont été normalisés sur ceux de la créatinine. Les concentrations sont alors exprimées en ng / μ mol de créatinine.

II.4.4. Mesure de la température corporelle et enregistrement de l'électroencéphalogramme

La température corporelle (Core Body Temperature, CBT) a été mesurée à chaque minute, chaque jour sur une durée de 22 h, puisqu'une interruption de 2 h a eu lieu entre 8 h 00 et 10 h 00 du matin. L'appareil télémétrique est un radiotransmetteur (PhysioTel® F40-EET; DSI, St. Paul, MN, USA) implanté chirurgicalement dans la cavité péritonéale (Coolen et al. 2012). La plus faible valeur observée pendant 24h, se nomme le Nadir. Elle a été relevée chaque jour, pour chaque animal.

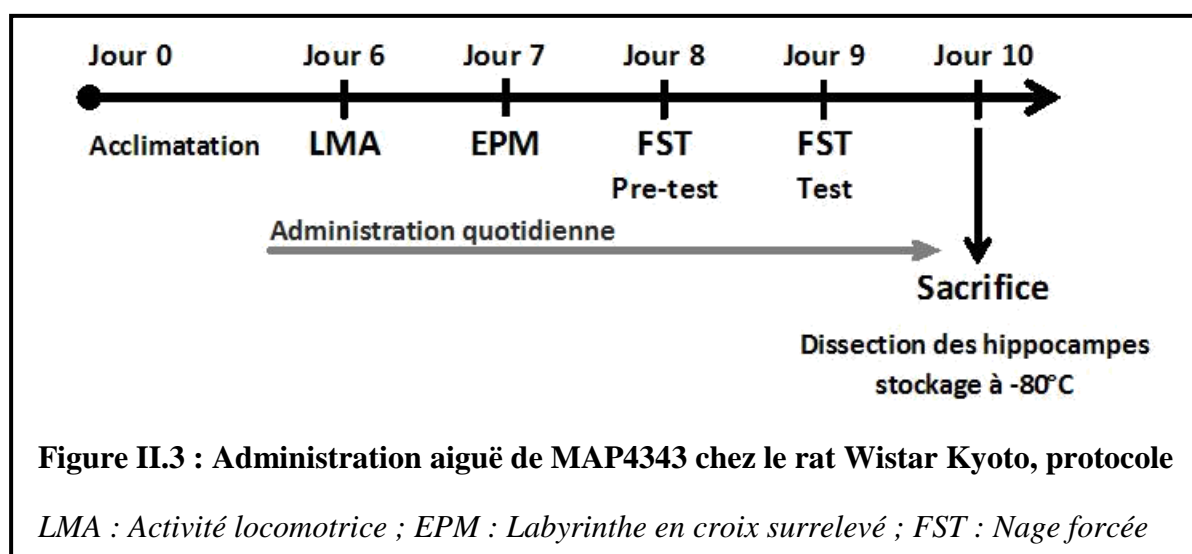
Les enregistrements de l'électroencéphalogramme (EEG) ont été réalisés entre 18 h 00 et 8 h 00. Pour ce faire, une électrode a été placée en contact avec la dure-mère, grâce à une perforation du crâne. Elle était reliée au radiotransmetteur précédemment cité (PhysioTel® F40-EET), en sous-cutané et grâce à une perforation des muscles abdominaux (Coolen et al. 2012). L'EEG permet de détecter les phases de veille et de sommeil. Au cours de la phase de sommeil, on peut distinguer le sommeil « Non Rapid Eye Movement », NREM et le sommeil paradoxal, « Rapid Eye Movement », REM. Le « temps total de sommeil » (en min) a été calculé en additionnant les temps de sommeil NREM et REM. En revanche, la période de sommeil correspond à la période (en min) entre le premier endormissement et le dernier réveil. Ainsi, l'efficacité du sommeil a été déterminée par le ratio suivant : « temps total de sommeil » sur « période de sommeil » (Coolen et al. 2012).

II.5. MODÈLE SPONTANÉ, LE WISTAR KYOTO

II.5.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est décrit dans la *figure II.3*. Quatre rats WI ou WKY ont cohabité dans la même cage. Tous les rats WI ont reçu une injection quotidienne de deux solutions de véhicule (saline et huile de sésame), tandis que les rats WKY ont été traités soit par la solution de MAP4343 (ils ont reçu le véhicule de la fluoxétine), soit par la solution de fluoxétine (ils ont reçu le véhicule du MAP4343), ou ont reçu les deux solutions de véhicules. Chaque groupe était constitué de 8 animaux.

Ainsi, le groupe « WI /Véhicule » a reçu de l'huile de sésame (250 µl/rat, s.c.) et de l'eau (1 ml/kg, i.p.), le groupe « WKY /Véhicule » a reçu également de l'huile de sésame (250 µl/rat, s.c.) et de l'eau (1 ml/kg, i.p.) ; le groupe « WKY /MAP4343 » a reçu du MAP4343 (10 mg/kg, s.c.) et de l'eau (1 ml/kg, i.p.) et le groupe « WKY /Fluoxétine » a reçu de l'huile de sésame (250 µl/rat, s.c.) et de la fluoxétine (10 mg/kg, i.p.).



La phase de tests a débuté au jour 6 (après 6 jours d'acclimatation dans l'animalerie). Les tests comportementaux se sont succédés comme décrit dans la figure II.3, durant 4 jours. Le traitement a eu lieu 1 heure avant le début des tests. Les animaux ont été sacrifiés au jour

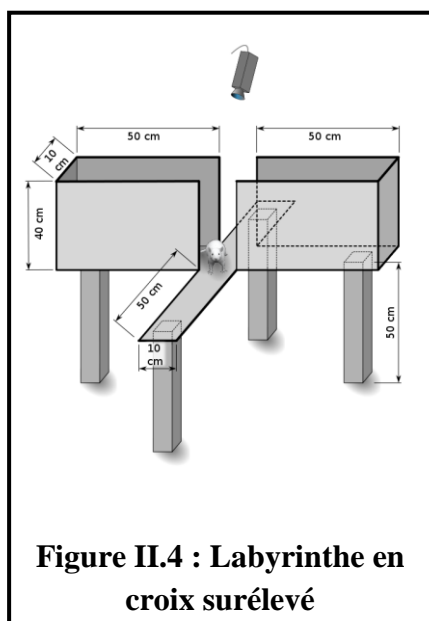
10, après la dernière injection, leurs cerveaux ont été prélevés et les hippocampes disséqués et immédiatement congelés à -80°C.

II.5.2. Tests de comportement

II.5.2.1. Activité locomotrice (LMA) et anxiété dans « l'open field »

Les animaux ont été placés individuellement sur une plateforme, dans un espace clos uniformément éclairé (50 ± 5 lux) ou « *Open Field* ». La surface au sol était du forex blanc de 70 x 100 x 45 cm (L x l x h) posé au-dessus d'un parterre de diodes infrarouges. Durant 3 min, une caméra surplombant la plateforme filmaient en infrarouge et les mouvements des rats étaient analysés grâce au logiciel VideoTrack V2.5 (ViewPoint, France). Les données collectées étaient 1) la distance parcourue sur toute la plateforme (cm), 2) le nombre d'entrées au centre (35 x 50 cm) de la plateforme et 3) le temps passé au centre (s).). La durée de seulement 3 min est due au protocole mis au point précédemment à MAPREG comprenant un test d'activité locomotrice systématiquement suivi par un test de reconnaissance de nouvel objet que nous n'avons pas réalisé, ici.

II.5.2.2. Labyrinthe en croix surélevé (EPM)



Un labyrinthe en forme de croix (« *Elevated Plus Maze* », EPM) surélevé à 50 cm du sol était constitué de deux bras ouverts (les bords béants) éclairés uniformément (40 ± 10 lux) et de deux bras fermés (bordures noires de 40 cm de hauteur). Chaque bras mesurait 50 cm de longueur x 10 cm de largeur, comme indiqué *figure II.4*. Une caméra surplombant le labyrinthe filmaient pour un test de 5 min. Les données mesurées étaient l'indice « *Open Arms* » (OA) correspondant au temps passé dans les bras ouverts

(s) divisé par le temps passé dans les quatre bras (s).

II.5.2.3. Test de nage forcée (FST)

Le test de nage forcée (FST) a été développé par Porsolt (Porsolt, Bertin, and Jalfre 1977). Il consiste à placer des rats dans de l'eau de sorte qu'ils ne touchent pas le fond. Le but de ce test est de créer une immobilité chez l'animal, exprimée par le fait de produire le minimum de mouvement pour ne pas couler. Cette immobilité est caractérisée par un état dit « de désespoir » (Porsolt, Bertin, and Jalfre 1977). Pour optimiser l'expérience du FST, les rats étaient testés deux par deux. Pour cela, deux rats étaient placés dans deux cylindres de plexiglas de 20 cm de diamètre et 40 cm de hauteur remplis avec 25 cm d'eau à 25 ± 1 °C. L'expérience se déroulait en deux temps. Au jour 8, les rats subissaient un pré-test qui consistait à les laisser 15 min dans les cylindres d'eau. Puis, au jour 9, ils étaient replacés 5 min dans les cylindres et le temps d'immobilité était mesuré.

II.6. DÉTECTION INFRAROUGE DE PROTÉINES MICROTUBULAIRES HIPPOCAMPIQUES PAR WESTERN BLOT

Les hippocampes ont été homogénéisés dans du tampon de lyse (5 mM -Tris HCl, 2 mM -EGTA, 2 % Protein Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, Quentin Fallavier, France) à 4 °C par sonication (Branson™ Sonifer-450). La concentration de protéines totales a été déterminée par colorimétrie à l'aide du réactif de Bradford (Sigma-Aldrich). Les homogénats ont été traités avec de la solution de Laemmli pour dénaturer les protéines : 62,5 mM -Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycérol, 2 % sodium dodécyl sulfate (SDS), 5 % β -(2)-mercaptoéthanol, 0,006 % bleu de bromophénol.

L'électrophorèse et la détection infrarouge ont été réalisées comme décrit précédemment (Ladurelle et al. 2012), avec quelques légères modifications. L'électrophorèse a été réalisée sur des gels composés de vingt-six puits et contenant 10 % de bisacrylamide/trisacrylamide,

pour la détection des tubuline α , tandis que pour la détection des MAP2, les gels étaient composés de 4-20 % de tris-glycine (NuPAGE, Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Après l'électrophorèse, les protéines étaient transférées sur une membrane PVDF (Millipore), grâce à un appareil de transfert à sec (Invitrogen). Les membranes étaient ensuite plongées dans du tampon de blocage (tampon phosphate salin (PBS, 50 %) et 50 % d'Odyssey Blocking Buffer) (OBB, ScienceTec, Villebon-sur-Yvette, France) pendant 1 h, puis incubées avec les anticorps primaires dans une solution : PBS/OBB + tween 20, 0,2 %. Les anticorps monoclonaux anti-tubuline α tyrosinée (Tyr-Tub; clone TUB-1A2, Sigma-Aldrich) et anti-tubuline α acétylée (Acet-Tub; clone 6-11B-1, Sigma-Aldrich) et les anticorps polyclonaux anti- tubuline α détyrosinée (Glu-Tub; Chemicon, Temecula, CA, USA) ont été dilués au 1:4000 et les membranes correspondantes incubées pendant 1 h à température ambiante. Les anticorps monoclonaux anti- tubuline α totale (Tot-Tub; clone DM-1A, Sigma-Aldrich) et anti-MAP2 (MAP2 a, b, c; clone HM2, Sigma-Aldrich) et les anticorps polyclonaux anti-MAP2 phosphorylée sur la sérine 136 (pMAP2; Cell signaling, Ozyme, Cergy-Pontoise, France) ont été dilués au 1:2000. Les membranes correspondantes ont été incubées toute la nuit à 4°C. Après quatre rinçages (15 min, dans une solution PBS/OBB + tween 20, 0,1 %), les membranes ont été incubées, pendant 1h, à température ambiante, avec les anticorps secondaires anti-souris IRDye 680 (détection infrarouge à 680 nm, LiCor, Lincoln, USA) ou anti-lapin IRDye 800 (détection infrarouge à 800 nm, LiCor), dilués à 1:10000 dans une solution PBS/OBB + tween 20, 0,2 % + SDS, 0,1 %.

Après quatre rinçages finaux (15 min, dans une solution PBS/OBB + tween 20, 0,1 %), les membranes séchées ont été numérisées grâce à un scanner Odyssey pour détecter le signal infrarouge. L'intensité du signal a été mesurée par le logiciel Odyssey V3.0 (LiCor, ScienceTec).

Notre protocole permet la double détection d'anticorps anti-tubuline α avec deux différentes modifications post-traductionnelles sur la même membrane ou bien de MAP2 et pMAP2 sur la même membrane également (*Article, Figure 6A*) ce qui permet le calcul du ratio Tyr/Glu-Tub, considéré comme un indice de dynamique microtubulaire (M. Bianchi et al. 2006), et le calcul du ratio pMAP2 /MAP2.

II.7. ANALYSE STATISTIQUE

Les données sont les moyennes \pm erreur standard à la moyenne (ESM) de mesures indépendantes pour chaque groupe d'animaux. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel InVivoStat[®] sur les données brutes.

Chez le toupaye, les données collectées chaque jour ont été moyennées sur une semaine, ce qui a permis d'obtenir des valeurs hebdomadaires pour chaque animal d'un même groupe. Ces valeurs hebdomadaires individuelles ont ensuite été moyennées afin d'obtenir une moyenne par semaine et par groupe. Pour comparer les variances au sein d'un même groupe, un test ANOVA à un facteur pour mesures répétées a été réalisé, suivi par un test post-hoc de Fisher permettant de comparer les moyennes des valeurs hebdomadaires.

Pour les Western blot, chez le toupaye, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé suivi d'un post-hoc de Dunn pour comparer les moyennes entre les deux groupes.

Chez le rat, le test utilisé était un ANOVA à un facteur (groupe) suivi, par un post-hoc de Fischer permettant de comparer les moyennes de chaque groupe. Pour le poids, il a été réalisé un ANOVA à deux facteurs : jour (apparié) et traitement (non-apparié) suivi par un post-hoc de Fischer.

Tous les tests paramétriques utilisés ont été justifiés par le fait que les données suivent une loi de distribution normale (données non-montrées).

III. RÉSULTATS

III.1. EFFICACITÉ ANTIDÉPRESSIVE DE LA 3B-MÉTHOXY-PRÉGNÉNONE (MAP4343) CHEZ LE TOUPAYE EXPOSÉ AU STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE, UN MODÈLE DE TROUBLES DÉPRESSIFS PROCHE DU PRIMATE

III.1.1. Synthèse des résultats de l'article soumis

L'efficacité préclinique du MAP4343 a été évaluée dans un modèle animal validé reproduisant des altérations comportementales et physiologiques observées chez le sujet dépressif. Il s'agit du toupaye de Belanger (n = 8) soumis à un stress psychosocial chronique (6 semaines, dont 4 semaines avec un traitement par du MAP4343) (*voir description du protocole dans le paragraphe II.4.1*). Dans cette expérience, le choix a été fait d'administrer la molécule par voie orale pour se rapprocher le plus possible des conditions de prise de médicament par les patients. Le groupe d'animaux (n = 8) traité avec la molécule a été comparé à un groupe contrôle d'animaux (6 semaines de stress avec traitement par du véhicule).

III.1.1.1. Concentration plasmatique du MAP4343 et effets du MAP4343 sur le poids

Tout d'abord, la molécule administrée quotidiennement (50 mg/kg/jour) pendant 4 semaines est bien retrouvée, à la fin du traitement, chez tous les animaux traités. En effet, la moyenne des concentrations plasmatiques après sacrifice est de 118.7 ± 32.3 nM. De plus, l'administration prolongée (4 semaines) du MAP4343 chez le toupaye stressé n'a pas montré d'effet significatif sur le poids des animaux, mais n'a pas permis non plus une récupération de la perte de poids induite par le stress psychosocial.

III.1.1.2. Effet du MAP4343 sur le comportement associé au stress psychosocial chronique

Les analyses des tests comportementaux montrent tout d'abord que l'exposition au stress psychosocial a diminué le score de l'activité locomotrice de façon durable dès la troisième

semaine de stress (*Article, Figure 3A*). En revanche, dans le groupe d'animaux traité avec le MAP4343, la molécule a empêché cette réduction (*Article, Figure 3A*). Ensuite, le stress a induit un comportement d'évitement de l'individu dominant par le dominé et ce phénomène a également été inhibé par la molécule. En effet, dans le groupe ne recevant que le véhicule, le stress psychosocial a diminué le nombre de passages dans la zone à risque, alors que dans le groupe d'animaux traités au MAP4343, ce nombre a été constant durant tout le protocole expérimental (*Article, Figure 3B*). De même, le temps passé dans la zone à risque a été progressivement réduit chez les animaux ne recevant que le véhicule, en particulier dans les dernières semaines de stress, alors que chez les animaux traités avec le MAP4343, ce temps est resté stable pendant toutes les semaines de stress (*Article, Figure 3C*). Ces résultats montrent que l'administration du MAP4343 est capable de prévenir les altérations du comportement locomoteur induites par le stress psychosocial.

III.1.1.3. Effet du MAP4343 sur les hormones urinaires

L'exposition au stress psychosocial a induit une augmentation du taux urinaire de cortisol durant les premières semaines du protocole. Le taux est resté élevé et stable durant les six semaines d'exposition au stress (*Article, Figure 4A*). L'administration de MAP4343 n'a pas permis de récupérer le taux basal de cortisol, mais a permis une baisse significative durant la troisième semaine de traitement (*Article, Figure 4A*).

D'autre part, il a également été observé, dès les premières semaines de stress, une augmentation du taux urinaire de noradrénaline. La valeur de ce taux a d'ailleurs montré une augmentation progressive dans le temps jusqu'à la fin de la période expérimentale (*Article, Figure 4B*). L'administration de MAP4343 n'a pas permis de récupérer le taux basal de noradrénaline, mais les animaux traités n'ont pas montré d'augmentation croissante de ce taux comme les animaux ayant reçu le placebo. Le traitement aurait donc limité l'augmentation

(Article, Figure 4B). Ces résultats suggèrent que le MAP4343 aurait un effet inhibiteur sur l'hyperactivation de l'axe HHS et du système sympathique induite par le stress psychosocial.

III.1.1.4. Effet du MAP4343 sur l'hyperthermie induite par le stress

L'hyperthermie est une réponse physiologique à un stress résultant de l'augmentation de l'activité métabolique. L'analyse de la mesure de la température corporelle a montré une augmentation de sa valeur au cours des semaines d'exposition au stress psychosocial chez les animaux ayant reçu le véhicule (Article, Figure 5A). Au cours des semaines de stress, cette augmentation est de plus en plus importante. L'administration de MAP4343 a permis d'inverser cette augmentation de température (Article, Figure 5B). De plus, la température la plus basse au cours de la nuit, le Nadir, a significativement augmenté au cours des semaines de stress chez les animaux recevant le véhicule. Chez les animaux traités au MAP4343, en revanche, cette mesure n'est pas significativement modifiée au cours de la période de stress (Figure 5C). Le traitement avec du MAP4343 réduit, donc l'hyperthermie induite par le stress psychosocial chronique.

III.1.1.5. Effet du MAP4343 sur les altérations du sommeil induites par le stress

La molécule a des effets positifs sur les altérations du sommeil induites par le stress psychosocial. Tout d'abord, la quantité totale de sommeil, diminuée par le stress psychosocial (Article, Figure 6A) chez les animaux ne recevant que le véhicule, n'a pas été modifiée chez les animaux traités par le MAP4343 (Article, Figure 6B). De plus, l'administration de MAP4343 a empêché les diminutions du sommeil paradoxal (REM) (Article, Figure 6D) et de l'efficacité du sommeil (Article, Figure 6F) observées chez les animaux ne recevant que le véhicule (Article, Figure 6C et 6E).

III.1.1.6. Étude du système microtubulaire hippocampique

Afin d'évaluer les conséquences du stress psychosocial chronique sur le système microtubulaire dans l'hippocampe, une analyse par Western blot des modifications post-traductionnelles de la tubuline α et de la phosphorylation de MAP2 a été réalisée. Les hippocampes ont été prélevés après la dernière semaine expérimentale, lors du sacrifice des animaux. Un groupe contrôle composé d'animaux n'ayant pas été soumis à un stress psychosocial a été ajouté pour permettre la comparaison avec un niveau basal d'expression des protéines. Tout d'abord, il a été observé que la quantité totale de tubuline α dans l'hippocampe des animaux n'était pas significativement différente dans les trois groupes (*Article, Figure 7B*). Ensuite, les résultats montrent une réduction du ratio Tyr/Glu-Tub (Tubuline α Tyrosinée / Tubuline α détyrosinée) dans les deux groupes d'animaux stressés (*Article, Figure 7C*). Ces résultats suggèrent une plus faible dynamique des microtubules de l'hippocampe chez les animaux stressés chroniquement. Le MAP4343 ne montre pas d'effet significatif sur ce phénomène. De plus, le stress psychosocial prolongé a induit une diminution de l'acétylation de la tubuline α . Cette diminution n'a pas été observée chez les animaux traités par le MAP4343 (*Article, Figure 7D*). Enfin, il a été mesuré une diminution de la phosphorylation de MAP2 chez les animaux stressés (*Article, Figure 7E*). Le MAP4343 n'a pas eu d'effet sur cette diminution.

L'analyse par Western blot suggère donc plusieurs phénomènes distincts induits par le stress modifiant l'état du système microtubulaire. Le MAP4343 semble agir de façon spécifique sur l'acétylation de la tubuline α chez des animaux de cette espèce soumis à un stress psychosocial chronique.

Les résultats présentés montrent une altération de paramètres comportementaux (locomotion, comportement d'évitement) et physiologiques (poids corporel, hormones du stress, sommeil et température corporelle) induite par l'exposition prolongée à un stress psychosocial. Ainsi, le MAP4343 prévient le comportement d'évitement de l'individu subordonné, réduit l'hyperactivation des hormones produites par le stress, inhibe l'hyperthermie et empêche les perturbations du sommeil.

De plus, l'investigation de l'hippocampe suggère des altérations microtubulaires chez les animaux ayant subi le stress psychosocial chronique. Cependant, les modifications observées n'ont pas toutes été corrigées par le traitement au MAP4343.

III.1.2. Article

Efficacy of 3 β -methoxy-pregnenolone (MAP4343) in tree shrews exposed to psychosocial stress suggests a new antidepressant approach

Soumis dans Neuropharmacology le 13/02/2015

Running title: Antidepressant effects of MAP4343

Lucie Parésys^{1*}, Kerstin Hoffmann^{2*}, Nicolas Froger¹, Massimiliano Bianchi¹, Etienne-Emile Baulieu^{1\$} and Eberhard Fuchs^{2\$}

¹MAPREG SAS, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

²German Primate Center, 37077 Göttingen, Germany

*these authors contributed equally to this work

\$Co-last authors

Addresses for corresponding authors

Etienne-Emile Baulieu, Nicolas Froger and Eberhard Fuchs

80, rue du General Leclerc

94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex (FRANCE)

Phone: + 33 (0) 1 49 59 18 03

Fax: + 33 1 49 59 92 03

Email: etienne.baulieu@inserm.fr, nicolas.froger@mapreg.com and efuchs@gwdg.de

Abbreviations:

AUC: area under curve; CBT: core body temperature; EEG: electroencephalogram; DDs: depressive disorders; MAP4343: 3 β -Methoxy-pregnenolone; LMA: locomotor activity; MAP2: microtubule associated protein 2; pMAP2: phosphorylated MAP2; REM: rapid eye movement sleep; Tot-tub: total α -tubulin, Tyr-Tub: tyrosinated α -tubulin; Glu-Tub: detyrosinated α -tubulin; Acet-Tub: acetylated α -tubulin.

Abstract:

Most currently available active antidepressant drugs are selective serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors. However, as their clinical efficacy is not immediate, long-term administration is often accompanied by substantial side effects, and numerous patients remain non- or partialresponders. We have recently found that the synthetic neurosteroid 3 β -methoxypregnenolone (MAP4343), which binds to the microtubule-associated-protein-2 (MAP2), can provide a novel therapeutic approach initially evidenced in experimental model of depressive disorders (DDs) in rat. In order to further validate the efficacy of MAP4343, we investigated effects of a longer treatment (4- week oral administration; 50 mg/kg/day) in a non-rodent species, the tree shrew, exposed to a chronic psychosocial stress which elicits to close-to-human symptoms observed in DDs. During the experimental period, physiological parameters were registered, including core body temperature and electroencephalogram, while animals were videotaped to analyze their avoidance behavior. Morning urines were collected for measurements of cortisol and noradrenaline levels. We found that treatment with MAP4343 abolished stress-triggered avoidance behavior and prevented hypothermia, hormone hypersecretion and sleep disturbances, demonstrating its antidepressant-like efficacy. Comparative treatment with fluoxetine also prevented some physiological alterations, while the hypersecretion of cortisol and sleep disturbances were not restored by fluoxetine, suggesting a better efficacy of MAP4343. Alpha-tubulin and MAP2 isoforms were finally measured in hippocampi. We found that MAP4343 reversed the specific decrease in acetylation of α -tubulin induced by psychosocial stress, while it did not modify the psychosocial stress-elicited reductions of tyrosinated α -tubulin and phosphorylated MAP2. Taken together, these data strongly suggest a potent antidepressant-like effect of MAP4343 demonstrated on translational parameters.

1. Introduction

Depressive disorders (DDs) are commonly observed in humans, with a lifetime prevalence of at least 10-15% (Kessler et al., 2003). Patients display a complex pattern of symptoms including depressed mood, weight loss and disturbed sleep (APA, 1994). The pathophysiology of DDs involves an alteration of the central monoaminergic system (Hamon and Blier, 2013). Hence, most currently used antidepressant drugs are selective serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors which modulate monoaminergic neurotransmission. However, their delayed clinical efficacy, with about half of target patients remaining non- or partial-responders (Fava and Davidson, 1996), and their adverse side effects responsible for discontinuation of treatment (Hamon and Blier, 2013), lead to a real clinical need for the development of a novel class of antidepressant molecules displaying both immediate and prolonged activities with reduced side effects.

Based on both neuroimaging and *post mortem* studies in depressed subjects (Duric et al., 2013), it has been observed that DDs are closely associated with major changes in neuronal morphology, including a reduced volume of relevant brain regions such as hippocampi (MacQueen et al., 2003). These modifications may result from alterations of neuroplasticity, i.e. neurite extension, synaptic remodeling, or synaptogenesis (Duman, 2002; McEwen, 1999) which all involve the cytoskeleton (Reines et al., 2004) and particularly the microtubular system. Microtubular instability is indeed a fundamental process for plasticity events (Rochlin et al., 1996), and recent studies have suggested abnormalities of brain microtubular system in animal models of DDs (Bianchi et al., 2006; Yang et al., 2009).

Over the last decade, neurosteroids were found to be modulators of the neuronal microtubular system. In particular, pregnenolone was shown to bind microtubule associated protein 2 (MAP2) (Murakami et al., 2000), as well as the non-metabolizable derivative

compound 3 β -Methoxy-pregnenolone (MAP4343), devoid of any hormonal activity (Fontaine-Lenoir et al., 2006). In addition, these two compounds demonstrated a stimulant action on microtubule assembly (Fontaine-Lenoir et al., 2006) and MAP4343 has recently displayed acute antidepressant activity in a validated rat model of DDs (Bianchi and Baulieu, 2012).

In order to demonstrate long-term antidepressant activity of MAP4343 we used a translational model for human depressive states. A prolonged psychosocial stress was created in male tree shrews by a recurrent introduction of one male into the territory of another male to develop a dominant/subordinate relationship. The tree shrew (*Tupaia belangeri*) is a day-active with relevant physiological and behavioral characteristics for addressing the pathophysiology of DDs (Fuchs, 2005). Subordinate animals display behavioral and physiological alterations, including sleep disturbances and nocturnal elevation of the core body temperature (CBT), similar to those observed in depressed humans. Psychosocial stress in tree shrews is thus considered to be a suitable model for the validation of anti-depressant drugs (Fuchs, 2005).

The aim of this study was to assess the effects of 4-weeks of daily administration of MAP4343 on behavioral, physiological and molecular responses to social stress in tree shrews. We found a potent and persistent antidepressant effect of MAP4343 on translational parameters.

2. Material and Methods

2.1. Animal maintenance

Adult male tree shrews of 1-2 years of age from the breeding colony of the German Primate Center (Göttingen, Germany) were used. Animals were kept singly housed from puberty onwards, in steel cages ($w \times d \times h = 50 \times 80 \times 125$ cm). Each cage contained a wooden nest box at floor level ($18 \times 15 \times 15$ cm) and a system of wooden tree branches at various levels. All animals were housed under a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 08:00; 200 lux) with $60 \pm 7\%$ relative humidity and an ambient temperature of $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (for details see Fuchs and Corbach-Söhle, 2010). The animals had *ad libitum* access to water and food (Altromin, Lage, Germany). For this study, minimum number of animals required to obtain consistent data was used. All animal experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of September 2010 (2010/63/EU) and were approved by the Lower Saxony Federal State Office for Consumer Protection and Food Safety, Germany.

2.2. MAP4343 preparation and administration

MAP4343 was dissolved in hydroxyethylcellulose (HEC) by sonication during 3 cycles of 15 pulses separated by 15 sec on ice (BransonTM Sonifer-450). Animals received either MAP4343 at 50 mg/kg/day (per os) or the vehicle (HEC) each day during the treatment period (see Fig 1A). Treatments were administrated between 8.00 a.m. and 8:30 a.m. A detailed methodology for oral pharmacological treatment in tree shrews has been previously described (Schmelting et al., 2014).

2.3. *Psychosocial stress in tree shrews*

As depicted in Figure 1, our experimental procedure involved two groups composed by either tree shrews orally treated by MAP4343 or untreated tree shrews receiving vehicle alone (n=8 for each group). During an initial 2-week control period (Wk 1 & 2), animals were separately housed in unstressed condition, with a daily administration of vehicle.

In the next 6-week period, psychosocial stress was applied to two groups of tree shrews. It consisted in the introduction of a naïve animal into the cage (“territory”) of a socially experienced male. For this purpose, the wire grid which separates the two males (Fig. 2) was removed once a day for approximately 1h, allowing interaction between the two animals. The animals engaged in a competition over the “territory” and established a dominant/subordinate relationship. During the first 2 weeks of stress (Wks 3 & 4) the two groups of tree shrews received vehicle. In the last 4 weeks of stress (Wk 5-8), MAP4343 treatment was administered daily (50 mg/Kg, *per os*) to the treated group while the untreated group received only vehicle (Fig. 1). During the whole experimental period animals were videotaped 1 hour per day to evaluate behavioral parameters and telemetry was continuously operated. In addition, body weight was measured and morning urine was collected every day.

At the end of the procedure animals were sacrificed by decapitation. Blood was collected in order to measure plasma MAP4343 concentrations and hippocampi were isolated, chilled and stored at -80°C until use.

2.4. *Behavioral experiments*

Behavioral experiments consisted in measurement of locomotor activity (LMA) and avoidance behavior. For this purpose the front panels of the cages were divided in 6 approximately equal areas (Fig 2). All animals were videotaped directly in their cages each

day for one hour in the late afternoon (from 4:30 p.m. to 5:30 p.m.). Data were then analyzed using EthoVision Pro 3.1 software (Noldus, Wageningen, the Netherlands).

2.4.1. Measurement of locomotor activity (LMA)

Tree shrews show a high degree of motor activity within their cages (Fuchs and Corbach-Sohle, 2010). Locomotor activity of each subordinate animal was recorded as an individual's frequency of crossings between adjacent areas in the cage (Kramer et al., 1999). The individual effect of psychosocial stress and drug-induced changes in locomotor activity were evaluated by counting the number of border crossings between the defined areas.

2.4.2. Evaluation of avoidance behavior

Areas 1 and 3, adjacent to the dominant animal's cage, were defined as a risk zone, while the zone constituted by areas 2, 4, 5 and 6 represented a safe zone (see Fig. 2). Hence, the evaluation of avoidance behavior consisted in the measurement of two parameters: (i) the number of border crossings for areas 1 and 3 and (ii) the total time (in min) spent in areas 1 and 3.

2.5. *Concentration of urinary hormones*

Urinary samples were collected each morning before the lights were turned on, under gloaming light, as previously described by Schmelting et al. (2014); urination was induced by applying a gentle massage to the hypogastrium. Noradrenaline levels were quantified by high pressure liquid chromatography after extraction on BioRex 70 cation-exchange columns (BioRad, Munich, Germany). Free cortisol levels were measured by a luminescence immunoassay kit (IBL International, Hamburg, Germany). In order to compensate for the various physiological urine dilutions, levels of the hormones were normalized and expressed

in ng/ μ mol of creatinine (Roche Modular P800 clinical chemistry analyzer with creatinine reagents according to Jaffe's method).

2.6. *Core body temperature*

CBT was recorded once a minute throughout the 24-hour period (except for the two hours between 8 a.m. and 10 a.m.) via a telemetric radiotransmitter (PhysioTel® F40-EET; DSI, St. Paul, MN, USA) surgically implanted in the peritoneal cavity (Coolen et al. 2012). The lowest value, named the Nadir, was specifically studied.

2.7. *Sleep recordings*

Electroencephalograms (EEG) were performed from 6 p.m. to 8 a.m. For this purpose, electrodes were placed in contact with the dura through a cranial hole, and subcutaneously connected to the radiotransmitter through a perforation of the abdominal muscles (Coolen et al. 2012). EEG recordings facilitated the distinction between rapid eye movement sleep (REM) and non-rapid eye movement sleep (nREM). Total sleep time (in min) was calculated by the addition of REM sleep time and nREM sleep time, while sleep efficiency was determined as the following ratio: total sleep time/sleep period time (the total sleep time consists in the sleep time without waking, while sleep period time refers to the period between the first and last sleep episode during the dark phase). For details on EEG analysis see Coolen et al. (2012).

2.8. *Plasma MAP4343 concentrations*

MAP4343 concentrations were measured by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) following a method developed by Bertin pharma (Orleans, France). After centrifugation (5 min, 4000 rpm at 4°C), 10 μ l of internal standard solution (pregnenolone acetate; 1 ng/ μ l and 700 μ l of bidistilled water) were added to plasma (40 μ l).

After mixing and centrifugation (3 min; 4000 rpm at 4°C), samples were prepared using a solid phase extraction (Oasis HLB cartridges). Samples were loaded into pre-conditioned columns: a first wash was performed with bidistilled water and a second with a mix of bidistilled water/acetonitrile (8/2, V/V). A final elution with methyl-tert-butyl ether (MTBE) allowed for the collection of products for derivation. This eluted phase was shaken and evaporated under a nitrogen stream at approximately 40°C. The residue was then dissolved in hydroxylamine solution (0.75 mol/l) and heated at 90°C for 30 min. Bidistilled water and MTBE were added and samples were shaken 5 min and centrifuged (4000 rpm for 5 min at 4°C). The organic-phase was evaporated under a stream of pure nitrogen at 40°C. The residue was dissolved in a mix of bidistilled water/acetonitrile (15/85, V/V) containing 0.1% acetic acid. After centrifugation (4000 rpm for 3 min at 4°C), the mixture (5 µl) was injected into an analytical column (XTerra MS C18, 2.1x100 mm, 5 µm; Waters, Guyancourt, France) for LC-MS/MS analysis.

2.9. *Infrared Western blot detection of hippocampal microtubular proteins*

Western blot analyses were performed on hippocampus extracts in two groups of stressed tree shrews, treated by MAP4343 or untreated, respectively. Data were compared to those obtained in a group of unstressed animals left undisturbed in their cages during the whole experimental period. All tree shrews were sacrificed by decapitation after the 8-week experimental period. The hippocampi were dissected on an ice-chilled plate and immediately frozen on dry ice and stored at -80°C until analysis. Hippocampi were homogenized in lysis buffer (5 mM -Tris HCl, 2 mM -EGTA, 2% Protein Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich, Quentin Fallavier, France) at 4°C through sonication (BransonTM Sonifer-450). Total protein concentrations were determined using a Bradford colorimetric assay (Sigma-Aldrich). Homogenates were then treated for protein denaturation with Laemmli buffer: 62.5 mM -Tris-

HCl (pH 6.8), 20% Glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 5% β -(2)-mercaptoethanol, 0.006% bromophenol blue. Electrophoresis and infrared Western blot analysis were performed as previously described by (Bianchi and Baulieu, 2012). Electrophoreses were performed on 26-well gels containing 10% bisacrylamide/trisacrylamide (for α -tubulin isoforms) or 4-20% tris-glycine for MAP2 isoforms (NuPAGE, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Proteins were transferred on to PVDF membranes (Millipore) using a dry blot system (Invitrogen). Membranes were blocked for 1h at room temperature in a solution of “Odyssey Blocking Buffer” diluted (1:2) in PBS (OBB/PBS buffer, ScienceTec, Villebon-sur-Yvette, France). They were then incubated with primary antibodies diluted in OBB/PBS + tween-20, 0.2%, *i.e.*: (i) the monoclonal mouse antibodies against total α -tubulin (1:2000; overnight at 4°C; clone DM-1A, Sigma-Aldrich), tyrosinated α -tubulin (1:2000; 1 hour at RT; clone TUB-1A2; Sigma-Aldrich), acetylated α -tubulin (1:4000; 1 hour at RT; clone 6-11B-1; Sigma-Aldrich) and total MAP2, a, b c (1:2000; overnight at 4°C ; clone HM2, Sigma-Aldrich), and (ii) the polyclonal rabbit antibodies against dephosphorylated α -tubulin (1:4000; 1 hour at RT; Chemicon, Temecula, CA, USA), and phosphorylated MAP2 on Ser136 (1:2000; overnight at 4°C; Cell signaling, Ozyme, Cergy-Pontoise, France). After 4 washings (15 min, in OBB/PBS + tween 20 0.1%), the membranes were incubated for 1h at RT with secondary antibodies, *i.e.*: the polyclonal goat anti-mouse IRDye 680 (infrared detection at 680 nm, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) or the polyclonal goat anti-rabbit IRDye 800 (infrared detection at 800 nm, Li-Cor), both diluted at 1:10000 in OBB/PBS + tween-20, 0.2% + SDS, 0.1%. Following 4 final washes (15 min, in OBB/PBS + tween-20, 0.1%), wet membranes were digitalized with the Odyssey scanner to detect the infrared signal of bands. Integrated intensities were then measured using the Odyssey V3.0 software (Li-Cor, ScienceTec). This protocol allowed for the simultaneous detection of α -tubulin or MAP2 isoforms on the same gel (See Fig. 6A),

permitting the calculation of the Tyr/Glu-Tub ratio, considered an index of microtubule dynamics (Bianchi et al., 2006), and the pMAP2/MAP2 ratio.

2.10. Statistical analyses

All data were obtained from independent animals and expressed as mean \pm SEM.

For behavioral and physiological measurements data were collected on a daily basis and weekly means were calculated. One way ANOVA analyses for repeated measures were performed to compare variances within each group, followed by the Fisher LSD post-hoc test to compare the means at each weekly data point.

For Western blot studies a non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance was performed, followed by the Dunn post-hoc test to compare means between groups. All tests were performed using InVivoStat Statistical Software.

Differences between groups were considered significant at the 95% confidence level ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Plasma MAP4343 concentrations

Plasma was collected from each animal at the end of the experimental period. We found that all tree shrews orally treated with MAP4343 displayed measurable plasma levels of MAP4343 in a nanomolar range; the mean concentration after the 4-week administration reached 118.7 ± 32.3 nM. Variability of MAP4343 plasma concentrations is obviously not surprising if we consider that our compound was orally administered.

3.2. Body weight (Table 1)

Psychosocial stress in animals receiving vehicle led to a significantly decreased body weight of approximately 5% at the end of experimental period ($F_{5,35}=2.14$, $p<0.05$). This significant decrease was observed during each week of the stress period as compared to the control period (Wk 2). The 4-week administration of MAP4343 did not modify the stress-induced decrease of the body weight ($F_{5,35}=2.14$, $p<0.001$).

3.3. Behavioral parameters (Fig. 3)

3.3.1. Locomotor activity (LMA)

In animals receiving vehicle, psychosocial stress affected LMA ($F_{5,35}=6.05$, $p<0.001$): a significant decrease in activity was found during most weeks of the stress period when compared to the control period (Wk 2; Fig. 3A, squares). In addition, LMA displayed a time-dependent reduction within the stress period, the value measured at the end of the stress period (Wk 8) was significantly reduced when compared to the first stress period (Wk 4, $p<0.05$). When animals received a 4-week oral administration of MAP4343, psychosocial stress did not significantly modify LMA ($F_{5,35}=1.89$, $p=0.12$; Fig. 3A, triangles). Thus, MAP4343 prevented a decrease of LMA during the social stress exposure.

3.3.2. Avoidance behavior

In tree shrews receiving vehicle, psychosocial stress was found to significantly reduce the number of border crossings in the risk zone ($F_{5,35}=2.65$; $p<0.05$; Fig 3B, squares), suggesting that stress triggered an avoidance behavior as previously described by Kramer et al. (1999). By contrast, when tree shrews were treated with MAP4343, no significant change in the number of border crossings in this zone was observed during social stress ($F_{5,35}=0.62$; $p=0.69$; Fig. 3B, triangles). Furthermore, we investigated the time spent in both areas 1 and 3, defining a second parameter for the assessment of avoidance behavior. Tree shrews receiving vehicle showed a progressive decrease in time spent in the risk zone during the stress period ($F_{5,35}=2.24$, $p=0.07$; Fig. 3C, squares). The values measured during the two last weeks of the stress period (Wk 7 and Wk 8) were significantly lower than those measured during the control period (Wk 2; $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively; Fig. 3C, squares). In contrast, long-term treatment with MAP4343 prevented the decrease in time spent in the risk zone during the stress period ($F_{5,35}=0.36$, $p=0.87$; Fig. 3C, triangles). Taken together these data strongly suggest that continuous administration of MAP4343 can prevent the psychosocial stress-triggered avoidance behavior in tree shrews.

3.4. *Neuroendocrine Function: Urinary hormone concentrations (Fig. 4)*

3.4.1. Cortisol concentrations

The psychosocial stress in tree shrews only receiving vehicle strongly increased cortisol concentrations ($F_{5,35}=6.40$, $p<0.001$; Fig. 4A, squares). This increase, measured during the beginning of the stress period (Wk 4), then remained stable until the end of the period (Wk 8; Fig. 4A, squares). In tree shrews treated with MAP4343, psychosocial stress also triggered a cortisol increase ($F_{5,35}=7.29$, $p<0.001$; Fig. 4A, triangles), but the 4-week treatment was able to significantly reduce the cortisol increase induced by stress exposure

during the third week of treatment (Wk 7, $p<0.01$ and $p<0.05$ when compared to Wk 4 and Wk 5, respectively; Fig. 4A).

3.4.2. Noradrenaline concentrations

The psychosocial stress in animals receiving vehicle triggered a hypersecretion of noradrenaline ($F_{5,30}=8.75$, $p<0.001$). Thus, the noradrenaline concentration was higher during the first stress period (Wk 4) as compared to the control period (Wk 2), and these significant increases grew progressively during the stress period (Fig. 4B, squares). In tree shrews treated with MAP4343, an increase in noradrenaline was also observed during the stress period ($F_{5,30}=3.30$, $p<0.05$), but the treatment resulted in the stabilization of the stress-induced noradrenaline increase (Fig 4B, triangles). This result suggests that MAP4343 is able to prevent the potentiation of noradrenaline increases triggered by exposure to prolonged psychosocial stress.

Core body temperature (Fig. 5)

3.4.3. Temperature area under curve (AUC)

In animals receiving vehicle, exposure to psychosocial stress induced an increase in core body temperature (CBT; $F_{2,14}=15.4$, $p<0.001$; Fig. 5A) during both diurnal and nocturnal phases, which was particularly marked during the nocturnal phase (Fig. 5A). The resulting AUC for total temperature (from both diurnal and nocturnal phases) was significantly increased during the beginning stress period (Wk 4) when compared to the control period (Wk 2). Moreover, this hyperthermia was further increased at the end of the stress period (Wk 8, Fig. 5A) as compared to the first stress period (Wk 4, Fig. 5A). When animals were treated with MAP4343, the stress-induced hyperthermia was almost completely abolished ($F_{2,14}=4.89$; $p<0.05$; Fig. 5B). Indeed, the elevated CBT observed during the first stress period

(Wk 4) was significantly reduced during the last stress week (Wk 8) as compared to the similar CBT measured during the control period (Wk 2; Fig. 5B).

3.4.4. Nadir for the nocturnal core body temperature

Nadir levels for nocturnal CBT were significantly increased during stress period in animals receiving vehicle ($F_{5,35}=3.40$, $p<0.05$; Fig. 5C, squares). By contrast, when tree shrews were treated by MAP4343, the nadir values were not significantly modified during the stress period ($F_{5,35}=0.15$, $p=0.97$; Fig. 5C, triangles).

Taken together, these results demonstrated that a 4-week treatment with MAP4343 prevents the psychosocial stress-induced hyperthermia and further underlies the antidepressant effect of MAP4343.

3.5. *Total sleep, REM and sleep efficiency (Fig. 6)*

An alteration of the total sleep time was observed in stressed tree shrews receiving vehicle ($F_{5,30}= 6.47$, $p<0.001$, Fig. 6A). Indeed, a significant decrease was reached during the last week of the stress period (Wk 8) when compared to that measured during the control period (Wk 2) and after two stress weeks (Wk 4; Fig 6A). Upon treatment with MAP4343 for 4 weeks, the alteration in total sleep time induced by the social stress was abolished ($F_{5,30}= 0.42$, $p=0.83$, Fig. 6B).

Similarly, total REM sleep time was significantly reduced by psychosocial stress in animals receiving vehicle ($F_{5,30}= 4.22$, $p<0.05$; Fig. 6C). The values were found to be lower during the final stress week (Wk 8) when compared to the control period (Wk 2, $p<0.001$) and the first stress period (Week 4, $p<0.05$; Fig. 6C). The 4-week MAP4343 administration prevented the stress-induced alteration of total REM sleep time ($F_{5,30}= 0.30$, $p=0.91$; Fig. 6D).

Finally, when sleep efficiency was evaluated, we found in animals receiving only the vehicle that the psychosocial stress induced a significant alteration of this index ($F_{5,30}= 3.35$,

p=0.016; Fig. 6E), which was prevented by the 4-week administration of MAP4343 ($F_{5,30}=1.92$, p=0.12; Fig. 6F).

Taken together, these results further demonstrated the antidepressant action of MAP4343 through a prevention of the sleep alterations triggered by the psychosocial stress in tree shrews.

3.6. *Western blot quantification of hippocampal microtubule proteins (Fig. 7)*

In order to quantify microtubular proteins believed to be related to microtubule dynamics, Western blot analyses were performed on hippocampi from stressed tree shrews either treated with MAP4343 or receiving vehicle, and data were compared to samples taken from a group of unstressed animals. We therefore quantified Total α -tubulin (Tot-Tub) and tyrosinated α -tubulin (Tyr-Tub), elements known to be enriched in dynamic microtubules. In addition, detyrosinated α -tubulin (Glu-Tub) and acetylated α -tubulin (Acet-Tub), both enriched in stable microtubules, were measured (Fig 7A). Total MAP2 (MAP2) and phosphorylated MAP2 (pMAP2) proteins were also determined and the ratio pMAP2/MAP2 was calculated (Fig 7A).

Expression of Tot-tub from hippocampus was not found to be significantly modified between the three groups, i.e. “Unstressed”; “Stressed, Untreated” and “Stressed, MAP4343-treated” (Fig. 7B). Exposure to psychosocial stress in animals receiving vehicle induced a significant reduction of the Tyr/Glu-Tub ratio (0.99 ± 0.02 in “Stressed, Untreated” group versus 1.20 ± 0.03 in “Unstressed” group, mean \pm SEM, Fig 7C). 4-week oral administration of MAP4343 did not significantly change the reduction of Tyr/Glu-Tub ratio induced by stress (1.01 ± 0.02 for “Stressed, MAP4343-treated” group, mean \pm SEM, Fig 7C). In addition, social stress exposure induced a significant decrease of the Acet-Tub expression in tree shrews receiving vehicle (1.01 ± 0.02 in “Stressed, Untreated” group versus 1.12 ± 0.03 in “Unstressed”

group, mean \pm SEM, Fig 7D). Interestingly, when stressed animals were treated with MAP4343, such treatment significantly restored the level of Acet-Tub expression (1.14 ± 0.02 in “Stressed, MAP4343-treated” group, mean \pm SEM; Fig. 7D). Finally, following psychosocial stress the proportion of pMAP2 was reduced in untreated tree shrews (1.00 ± 0.01 in “Stressed, Untreated” group vs 1.05 ± 0.01 in “Unstressed” group, Fig 7E) and MAP4343 did not modify such pMAP2 decrease (0.97 ± 0.005 in “Stressed, MAP4343-treated” group; Fig 7E).

4-Discussion

In this study, we have demonstrated that MAP4343 exerts a long-term antidepressant efficacy in tree shrews subjected to 6 weeks of psychosocial stress. The face validity of this model was provided by behavioral, endocrine and physiological changes produced by long-term stress exposure and considered similar to those described in human beings (Fuchs, 2005). We found that social stress triggered a decrease in body weight likely due to a reduced food intake and a higher metabolic rate (Kramer et al., 1999), an increase of nocturnal CBT, and a decrease of LMA associated to a stimulation of avoidance behavior. In addition, stressed tree shrews displayed a constant stimulation of stress-related hormones (cortisol and noradrenaline). Finally, we have here first demonstrated that our model displays another feature of stress-related human depression symptoms consisting in sleep alterations, further reinforcing its face validity. The predictive validity of this model was shown by the observed treatment efficacy of both classical (SSRI or clomipramine) and atypical (tianeptine, NK1 antagonists, agomelatine) antidepressant drugs (Lucassen et al., 2004; Michael-Titus et al., 2008; Schmelting et al., 2014; van der Hart et al., 2005)

3.7. *Robust and long-term MAP4343 antidepressant efficacy*

Interestingly, prolonged administration of MAP4343 allowed substantial improvement of most depressive state parameters elicited by psychosocial stress, with the exception of decreased body weight under our experimental conditions. Similar results were observed previously with tianeptine (Lucassen et al., 2004) and clomipramine (Wang et al., 2013) treatment, neither of which was able to rescue body weight decreases. However, the body weight reduction observed was no greater than that in vehicle controls, evoking an absence of side-effects from MAP4343 on food intake, contrary to results observed with fluoxetine which is believed to regulate serotonin-induced satiety (Halford et al., 2005).

Hence, MAP4343 has successfully prevented behavioral changes such as decreased LMA and augmented avoidance behavior. The decrease of LMA appeared at the beginning of the stress period; MAP4343 prevented this behavioral alteration during the first week of treatment. Similar effects were observed with clomipramine (Fuchs et al., 1996; Kramer et al., 1999; Wang et al., 2013), agomelatine (Schmelting et al., 2014) and the NK1 receptor antagonist, L-760735 (van der Hart et al., 2005). In contrast, the avoidance response was triggered during the last two weeks of social stress exposure. Interestingly, MAP4343 also provided a preventive effect on this later behavioral response, suggesting the long-term effect of the tested compound.

MAP4343 displayed efficacy in reducing the increase of the adrenal cortical hormone, cortisol, by social stress. Responses to stressful events involve among other physiological reaction, the stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, leading to an increase in cortisol concentrations, and have been related to the pathophysiology of DDs (Holsboer, 2001). Such cortisol responses, previously observed in our model (Johren et al., 1994; Kozicz et al., 2008; Meyer et al., 2001), were progressively decreased by MAP4343 administration after the 3rd week of treatment, as described with fluoxetine and agomelatine after the 4th week of treatment (Schmelting *et al*, 2014), or with clomipramine (Kramer et al., 1999; Magarinos et al., 1996), although the effect on cortisol secretion was not systematically reproducible with this latter drug (van der Hart et al., 2005). Furthermore, MAP4343 counteracted the activation of the neurosympathetic system by blocking the time-dependent increase of noradrenaline secretion triggered by prolonged stress exposure. Such an action was also observed with agomelatine at the 4th week of treatment (Schmelting et al., 2014), while clomipramine displayed contrasting effects on noradrenaline (Kramer et al., 1999; van der Hart et al., 2005).

Stress-induced hyperthermia is a well-known response to stressors in rodents (Bouwknicht et al., 2007) and in humans (Marazziti et al., 1992). Indeed, following stress events, energy sources such as glucose are more available, while heart rate and core body temperature concurrently increase (Plaut and Friedman, 1982). Regarding these physiological parameters, our data show that chronic social stress elicited an elevation of the core body temperature, as previously described (Kohlhause et al., 2011), and that MAP4343 was able to abolish such an effect, similarly to agomelatine and more efficiently than fluoxetine (Schmelting et al., 2014). In depressive patients, a clear-cut increase of nocturnal body temperature was described during the depressive phase and corrected during the remission (Souetre et al., 1988). Our data from CBT recordings appear therefore strongly relevant to characterize the MAP4343 antidepressant effect.

Investigations on the pathophysiology of DDs have yielded a number of highly replicable sleep abnormalities in humans (Arfken et al., 2014; Wulff et al., 2010). In tree shrews, we first show that psychosocial stress led to sleep alterations consisting in the decrease of total sleep time and the sleep efficiency observed at the end of the stress period. A decrease of REM sleep time was also observed, probably related to the decrease of total sleep time. Our molecule normalized all these sleep alterations which are late responses to psychosocial stress.

Taken together, these results strongly demonstrate the efficacy of MAP4343 as an antidepressant drug affecting late functional alterations in tree shrews exposed to psychosocial stress. MAP4343 efficacy was also found at the beginning of the stress period on some early parameters, suggesting that it can exert a rapid antidepressant effect, as previously observed in rats (Bianchi and Baulieu, 2012).

3.8. *MAP4343 and the microtubular system*

The reduction of hippocampal volume observed in patients affected with depressive disorders (MacQueen et al., 2003), was also described in stressed tree shrews (Czeh et al., 2001), in parallel to a dendritic shrinkage of pyramidal neuron in CA3 region (Magarinos et al., 1996). These changes suggest modifications of cytoskeletal components, including microtubules. Since MAP4343 may modulate the microtubular system (Fontaine-Lenoir et al., 2006), we assessed the expression of various isoforms of α -tubulin and the phosphorylation of MAP2, as markers of microtubular dynamics. We found here that stress-induced behavioral and physiological alterations were accompanied by a specific reduction of tyrosinated α -tubulin, acetylated α -tubulin and phosphorylated MAP2 in the hippocampus. Tyrosinated α -tubulin is associated with neurite regrowth (Marcos et al., 2009) and has been found to be more abundant in neo-polymerized, young microtubules (Peris et al., 2006), whereas detyrosinated α -tubulin and acetylated α -tubulin are detected in polymerized tubulin over time. The presence of the latter isoform may account for more stable microtubules (Webster and Borisy, 1989), but the function of acetylation remains unclear. MAP2 is mainly present in neurons, and is predominantly localized in dendrites rather than axons (Garner et al., 1988). Phosphorylation of MAP2 is a complex process mediated by various kinases (Sanchez et al., 2000). The non-phosphorylated isoform of MAP2 is believed to stabilize microtubules, thereby increasing their rigidity (Felgner et al., 1997; Hirokawa, 1994), while the phosphorylated isoform may induce its dissociation from the microtubule (Murthy and Flavin, 1983), thereby promoting cytoskeleton instability. Taken together, our results suggest that exposure to psychosocial stress reduced the microtubular dynamics and may lead to an alteration in neuronal plasticity. A decrease in tyrosinated α -tubulin in hippocampus was previously described in rats subjected to both acute and chronic stress (Bianchi et al., 2006; Bianchi et al., 2003; Yang et al., 2009). We found here that prolonged social stress also

reduced the expression of acetylated α -tubulin, contrary to observations after acute stress in rats (Bianchi and Baulieu, 2012). *In vitro* studies assessing the effect of the depolymerizing agent, nocodazole, revealed a biphasic effect on α -tubulin isoforms, i.e. a rapid decrease in the tyrosinated α -tubulin followed by a decrease in acetylated α -tubulin in purified microtubules (Baas et al., 1991). Regarding these results, we hypothesize that the decrease in acetylation might be considered as a delayed marker of alterations of the microtubular system following a prolonged stress exposure, whereas the decrease in tyrosinated α -tubulin might be considered as an early marker for acute stress which persists throughout the stress exposure. Long-term administration of MAP4343 to tree shrews did not rescue the tyrosinated α -tubulin isoforms, but it did prevent the decrease in acetylated α -tubulin. This suggests that such administration of MAP4343 regulated the acetylation of α -tubulin, a process which may be altered in cases of prolonged microtubular injury, underlying the putative role of our compound to preserve neuronal microtubular dynamic functionality.

3.9. Conclusion

Here, we demonstrated that MAP4343 exerts a potent and long-term antidepressant efficacy by preventing the most deleterious effects of psychosocial stress in tree shrews. In our model which displays stress-induced alterations and reproduces many of those observed in depressed human beings, MAP4343 efficacy was either similar or better than other antidepressants previously tested. This study describes a new antidepressant with a never before considered target and therefore opens new perspectives toward innovative therapeutic strategies centered on the brain's microtubular system. Further investigations are in progress to elucidate cellular mechanisms (cerebral plasticity, neurogenesis) underlying such antidepressant efficacy.

Acknowledgements

We thank to Dr Isabelle Villey, Dr Nataly Ladurelle, Dr Vincent Fournet, Julie Cottin and Jennifer Leandri for their helpful contributions to this work. We are grateful to Simone Lüert, Simone Barsky and Andreas Heutz for analyses of urine samples, and to Heino Hartung and Achim Lück for management of the animal facility. We would like to offer a particular thank to Simon Bates for his help in statistics and data analysis. Measurements of amounts of MAP4343 in plasma were performed by Bertin Pharma and we are grateful to Jordan Goncalves for its contribution in the redaction of the protocol. This present work was supported by the “European Union Eureka/Eurostars Depression and Steroids” grant E!5291 (“DEPSTER” project).

References

- APA, 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Health Disorders (4th edn). American Psychiatric Association, Washington DC.
- Arfken, C. L., Joseph, A., Sandhu, G. R., Roehrs, T., Douglass, A. B., Boutros, N. N., 2014. The status of sleep abnormalities as a diagnostic test for major depressive disorder. *J Affect Disord* 156, 36-45.
- Baas, P. W., Slaughter, T., Brown, A., Black, M. M., 1991. Microtubule dynamics in axons and dendrites. *J Neurosci Res* 30, 134-153.
- Bianchi, M., Baulieu, E. E., 2012. 3beta-Methoxy-pregnenolone (MAP4343) as an innovative therapeutic approach for depressive disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1713-1718.
- Bianchi, M., Fone, K. F., Azmi, N., Heidbreder, C. A., Hagan, J. J., Marsden, C. A., 2006. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 24, 2894-2902.
- Bianchi, M., Heidbreder, C., Crespi, F., 2003. Cytoskeletal changes in the hippocampus following restraint stress: role of serotonin and microtubules. *Synapse* 49, 188-194.
- Bouwknicht, J. A., Olivier, B., Paylor, R. E., 2007. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 41-59.
- Czeh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., Fuchs, E., 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12796-12801.
- Duman, R. S., 2002. Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1, S29-34.
- Duric, V., Banasr, M., Stockmeier, C. A., Simen, A. A., Newton, S. S., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Dieter, L., Duman, R. S., 2013. Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 69-82.
- Fava, M., Davidson, K. G., 1996. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. *Psychiatr Clin North Am* 19, 179-200.
- Felgner, H., Frank, R., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., Ludin, B., Matus, A., Schliwa, M., 1997. Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol* 138, 1067-1075.
- Fontaine-Lenoir, V., Chambraud, B., Fellous, A., David, S., Duchossoy, Y., Baulieu, E. E., Robel, P., 2006. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4711-4716.

- Fuchs, E., 2005. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder. *CNS Spectr* 10, 182-190.
- Fuchs, E., Corbach-Sohle, S., 2010. "Tree Shrews." In: Hubrecht, R., Kirkwood, J., (Eds), *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, Eighth Edition. Wiley-Blackwell., pp. 262-275.
- Fuchs, E., Kramer, M., Hermes, B., Netter, P., Hiemke, C., 1996. Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 219-228.
- Garner, C. C., Tucker, R. P., Matus, A., 1988. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336, 674-677.
- Halford, J. C., Harrold, J. A., Lawton, C. L., Blundell, J. E., 2005. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets* 6, 201-213.
- Hamon, M., Blier, P., 2013. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 45, 54-63.
- Hirokawa, N., 1994. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 74-81.
- Holsboer, F., 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62, 77-91.
- Johren, O., Flugge, G., Fuchs, E., 1994. Hippocampal glucocorticoid receptor expression in the tree shrew: regulation by psychosocial conflict. *Cell Mol Neurobiol* 14, 281-296.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K. R., Rush, A. J., Walters, E. E., Wang, P. S., National Comorbidity Survey, R., 2003. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289, 3095-3105.
- Kohlhause, S., Hoffmann, K., Schlumbohm, C., Fuchs, E., Flugge, G., 2011. Nocturnal hyperthermia induced by social stress in male tree shrews: relation to low testosterone and effects of age. *Physiol Behav* 104, 786-795.
- Kozicz, T., Bordewin, L. A., Czeh, B., Fuchs, E., Roubos, E. W., 2008. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology* 33, 741-754.
- Kramer, M., Hiemke, C., Fuchs, E., 1999. Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: time-dependent behavioral and endocrine effects. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 937-947.
- Lucassen, P. J., Fuchs, E., Czeh, B., 2004. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry* 55, 789-796.

- MacQueen, G. M., Campbell, S., McEwen, B. S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R. T., Nahmias, C., Young, L. T., 2003. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1387-1392.
- Magarinos, A. M., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E., 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 16, 3534-3540.
- Marazziti, D., Di Muro, A., Castrogiovanni, P., 1992. Psychological stress and body temperature changes in humans. *Physiol Behav* 52, 393-395.
- Marcos, S., Moreau, J., Backer, S., Job, D., Andrieux, A., Bloch-Gallego, E., 2009. Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS One* 4, e5405.
- McEwen, B. S., 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22, 105-122.
- Meyer, U., van Kampen, M., Isovich, E., Flugge, G., Fuchs, E., 2001. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. *Hippocampus* 11, 329-336.
- Michael-Titus, A. T., Albert, M., Michael, G. J., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., Pudovkina, O., van der Hart, M. G., Hesselink, M. B., Fuchs, E., Czeh, B., 2008. SONU20176289, a compound combining partial dopamine D(2) receptor agonism with specific serotonin reuptake inhibitor activity, affects neuroplasticity in an animal model for depression. *Eur J Pharmacol* 598, 43-50.
- Murakami, K., Fellous, A., Baulieu, E. E., Robel, P., 2000. Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3579-3584.
- Murthy, A. S., Flavin, M., 1983. Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP-2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase. *Eur J Biochem* 137, 37-46.
- Peris, L., Thery, M., Faure, J., Saoudi, Y., Lafanechere, L., Chilton, J. K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., Job, D., 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* 174, 839-849.
- Plaut, S. M., Friedman, S. B., 1982. Stress, coping behavior and resistance to disease. *Psychother Psychosom* 38, 274-283.
- Reines, A., Cereseto, M., Ferrero, A., Bonavita, C., Wikinski, S., 2004. Neuronal cytoskeletal alterations in an experimental model of depression. *Neuroscience* 129, 529-538.
- Rochlin, M. W., Wickline, K. M., Bridgman, P. C., 1996. Microtubule stability decreases axon elongation but not axoplasm production. *J Neurosci* 16, 3236-3246.

- Sanchez, C., Diaz-Nido, J., Avila, J., 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61, 133-168.
- Schmelting, B., Corbach-Sohle, S., Kohlhaase, S., Schlumbohm, C., Flugge, G., Fuchs, E., 2014. Agomelatine in the tree shrew model of depression: effects on stress-induced nocturnal hyperthermia and hormonal status. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 437-447.
- Souetre, E., Salvati, E., Wehr, T. A., Sack, D. A., Krebs, B., Darcourt, G., 1988. Twenty-four-hour profiles of body temperature and plasma TSH in bipolar patients during depression and during remission and in normal control subjects. *Am J Psychiatry* 145, 1133-1137.
- van der Hart, M. G., de Biurrun, G., Czeh, B., Rupniak, N. M., den Boer, J. A., Fuchs, E., 2005. Chronic psychosocial stress in tree shrews: effect of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 and clomipramine on endocrine and behavioral parameters. *Psychopharmacology (Berl)* 181, 207-216.
- Wang, J., Chai, A., Zhou, Q., Lv, L., Wang, L., Yang, Y., Xu, L., 2013. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate tree shrews. *PLoS One* 8, e80980.
- Webster, D. R., Borisy, G. G., 1989. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci* 92 (Pt 1), 57-65.
- Wulff, K., Gatti, S., Wettstein, J. G., Foster, R. G., 2010. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 11, 589-599.
- Yang, C., Wang, G., Wang, H., Liu, Z., Wang, X., 2009. Cytoskeletal alterations in rat hippocampus following chronic unpredictable mild stress and re-exposure to acute and chronic unpredictable mild stress. *Behav Brain Res* 205, 518-524.

Figures

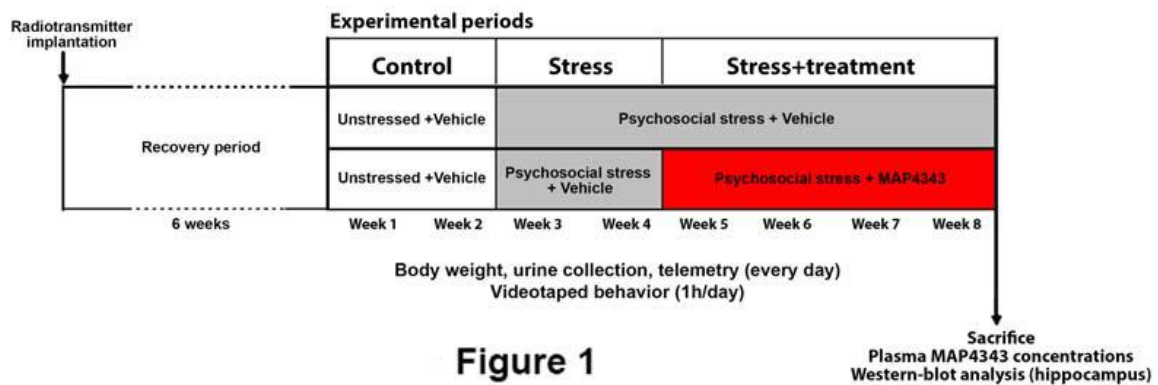


Figure 1: Experimental design

Scheme depicting the timing of psychosocial stress and oral administration of MAP4343 or vehicle, respectively. During the recovery period (6 weeks) following the radiotransmitter implantation, the animals remained undisturbed. The stress procedure followed the standard protocol described by Schmelting et al. (2014)

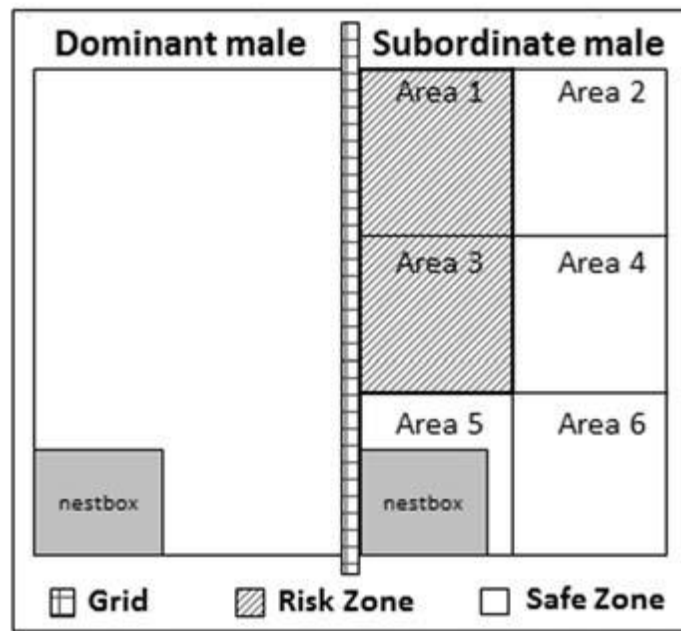


Figure 2: Schematic representation of cages

The cage of a subordinate male tree shrew was separated by a grid from the cage of a dominant male, and its front panel was divided in six areas in order to measure the locomotor activity of animals. Two areas (area 1 and area 3) adjacent to the cage of the dominant male were considered to form a risk zone, whereas the other areas (2, 4, 5, 6) constituted a safe zone.

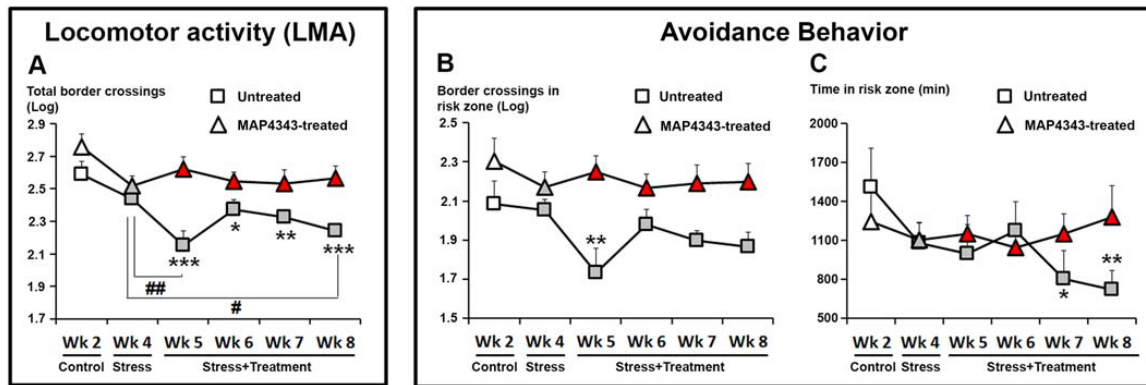


Figure 3: Effects of 4-week administration of MAP4343 on LMA and avoidance behavior in stressed tree shrews

A: Curves representing total LMA recorded during the whole experimental period in stressed tree-shrews receiving either vehicle (squares) or treated with MAP4343 (triangles). Data, expressed in log space, are weekly means \pm SEM calculated from daily measurements in independent animals (n=8).

B: Curves representing the numbers of border crossings in the risk zone, recorded during the whole experimental period in stressed tree-shrews receiving either vehicle (squares) or treated with MAP4343 (triangles). Data, expressed in log space, are weekly means \pm SEM calculated from daily measurements in independent animals (n=8).

C: Curves representing the time spent in the risk zone recorded during the whole experimental period, in stressed tree-shrews receiving either vehicle (squares) or MAP4343 (triangles). Data, expressed as minutes, are weekly means \pm SEM calculated from daily measurements in independent animals (n=8).

White items represent the values obtained during the control, unstressed period, the grey items represent the values obtained during the stress period in untreated conditions and red items represent the values obtained during the stressed period in MAP4343-treated conditions.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ when compared to the control period (Wk 2); # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ when compared between the indicated weeks (One-way ANOVA for repeated measures followed by a Fisher's LSD test to compare means from each week within each respective group).

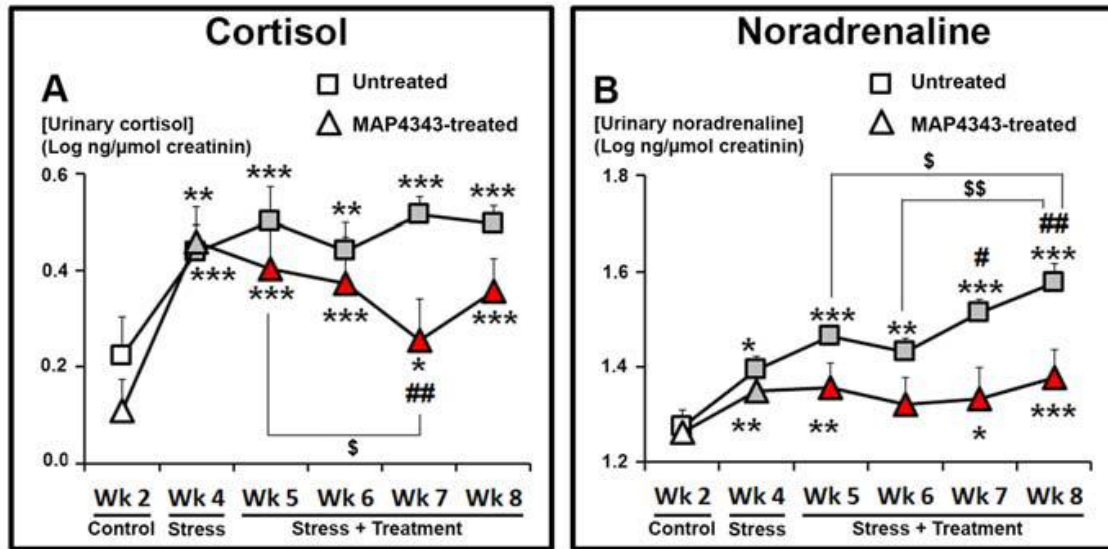


Figure 4: Effects of 4-week administration of MAP4343 on urinary hormone levels in stressed tree shrews

Curves representing urinary cortisol (A) noradrenaline (B) concentrations during the whole experimental period in stressed tree shrews receiving either vehicle (squares) or MAP4343 (triangles). Data, expressed as the log of ng of cortisol per μmol of creatinine, are weekly means \pm SEM calculated from daily measurements in each independent animals ($n=8$).

White items represent the values obtained during the control unstressed period, the grey items represent the values obtained during the stress period in untreated conditions and red items represent the values obtained during the stress period in MAP4343-treated conditions.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ when compared to the control period (Wk 2); # $p<0.05$ and ## $p<0.01$ when compared to the first stress period (Wk 4); \$ $p<0.05$ and \$\$ $p<0.01$ when compared between the indicated weeks (One-way ANOVA for repeated measures followed by a Fisher's LSD test to compare means from each week within each respective group).

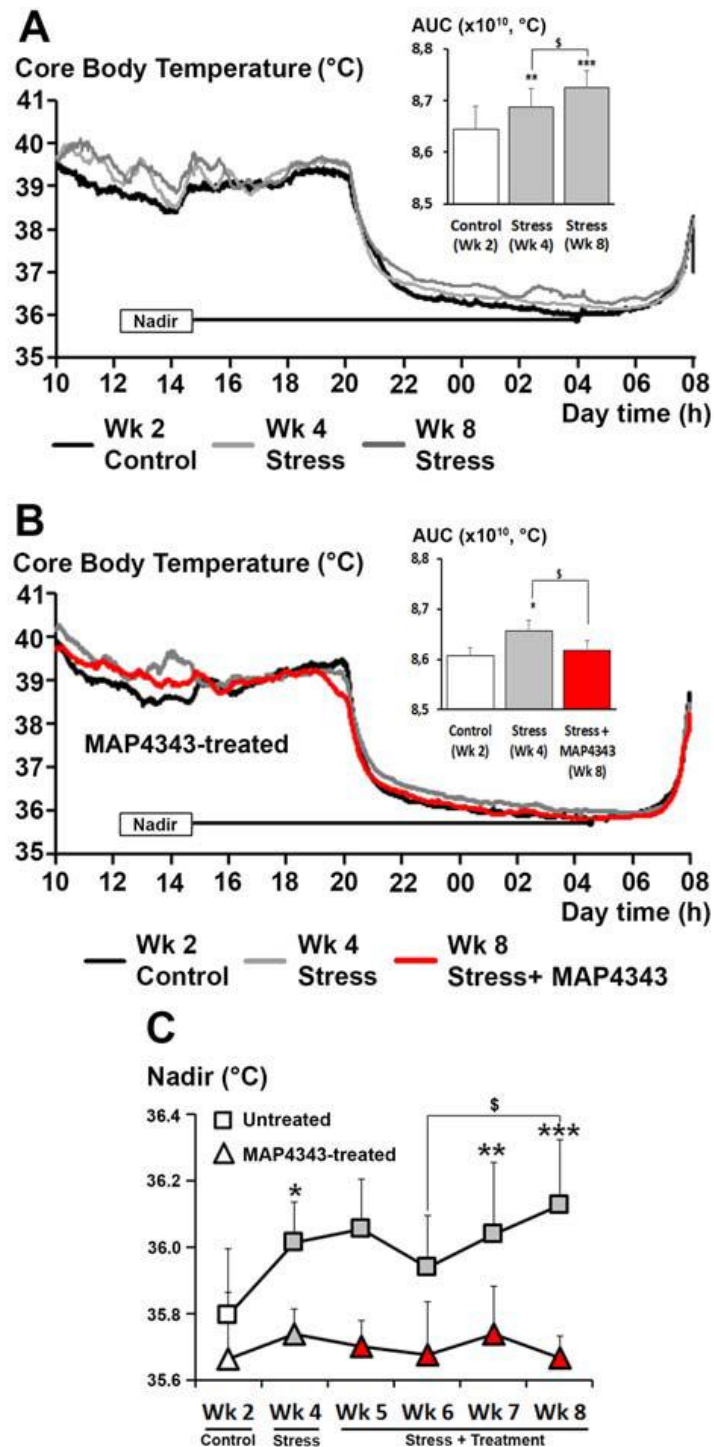


Figure 5: Effect of 4-week administration of MAP4343 on core body temperature in stressed tree shrews

A-B: Representative curves, showing the core body temperature recorded in stressed tree shrews receiving either vehicle (A) or MAP4343 (B) during the unstressed control period

(Wk 2; black color), the first stress period (Wk 4, light grey color) and the last stress period (Wk 8, dark grey color in A or red color in B). The islet graphs represent the respective areas under curves (AUC). Data are means \pm SEM obtained from independent animals (n=8 for each group).

C: Curves representing the nadir of core body temperature measured during the whole experimental period in stressed tree shrews receiving either vehicle (squares) or MAP4343 (triangles). Data, expressed as degrees Celsius, are weekly means \pm SEM calculated from daily measurements in each independent animal (n=8).

White items represent the values obtained during the control unstressed period, the grey items represent the values obtained during the stress period in untreated conditions and red items represent the values obtained during the stressed period in MAP4343-treated conditions.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ when compared to the control period (Wk 2); \$ $p < 0.05$ when compared between the indicated weeks (One-way ANOVA for repeated measures followed by a Fisher's LSD test to compare means from each week within each respective group).

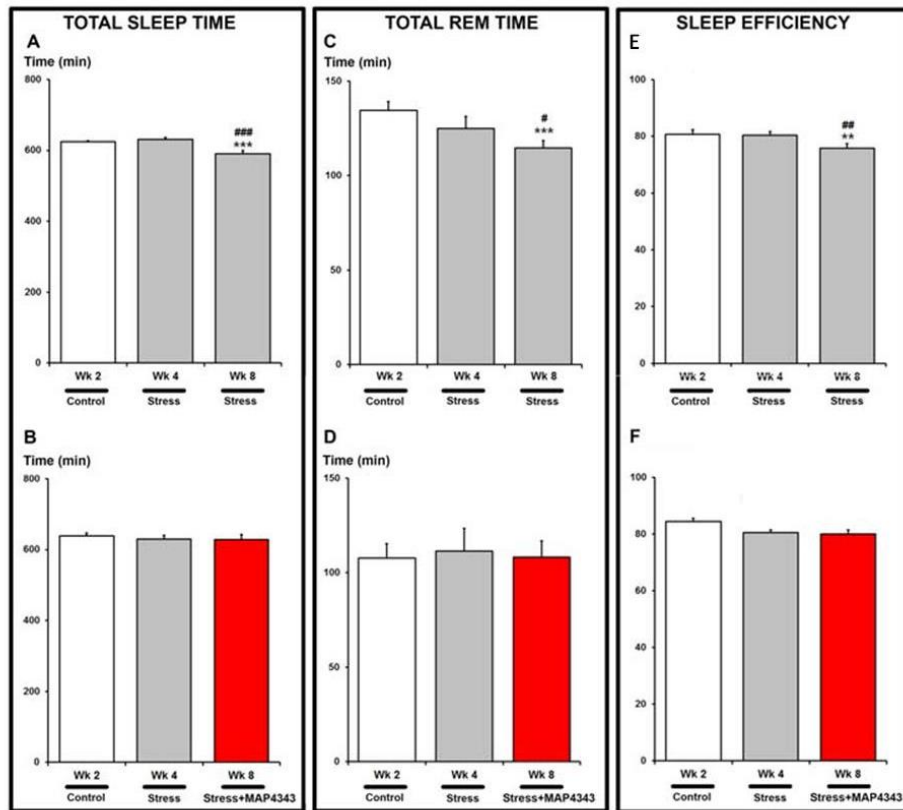


Figure 6: Effect of 4-week administration of MAP4343 on total sleep, REM and sleep efficiency in stressed tree shrews

Histograms representing total sleep time (A, B), total REM sleep time (C, D) and sleep efficiency (E, F), evaluated by EEG recordings during the whole experimental period in stressed tree shrews receiving either vehicle (A, C, E) or MAP4343 (B, D, F). Data, expressed as minutes (A-D) or as percentage of sleep efficiency (E, F), are means \pm SEM from independent animals (n=7 for each group).

p<0.01 and *p<0.001 when compared to the control period (Wk 2); #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 when compared to the first stress period (Wk 4) (One-way ANOVA for repeated measures followed by a Fisher's LSD post-hoc test to compare means from each week within each respective group).

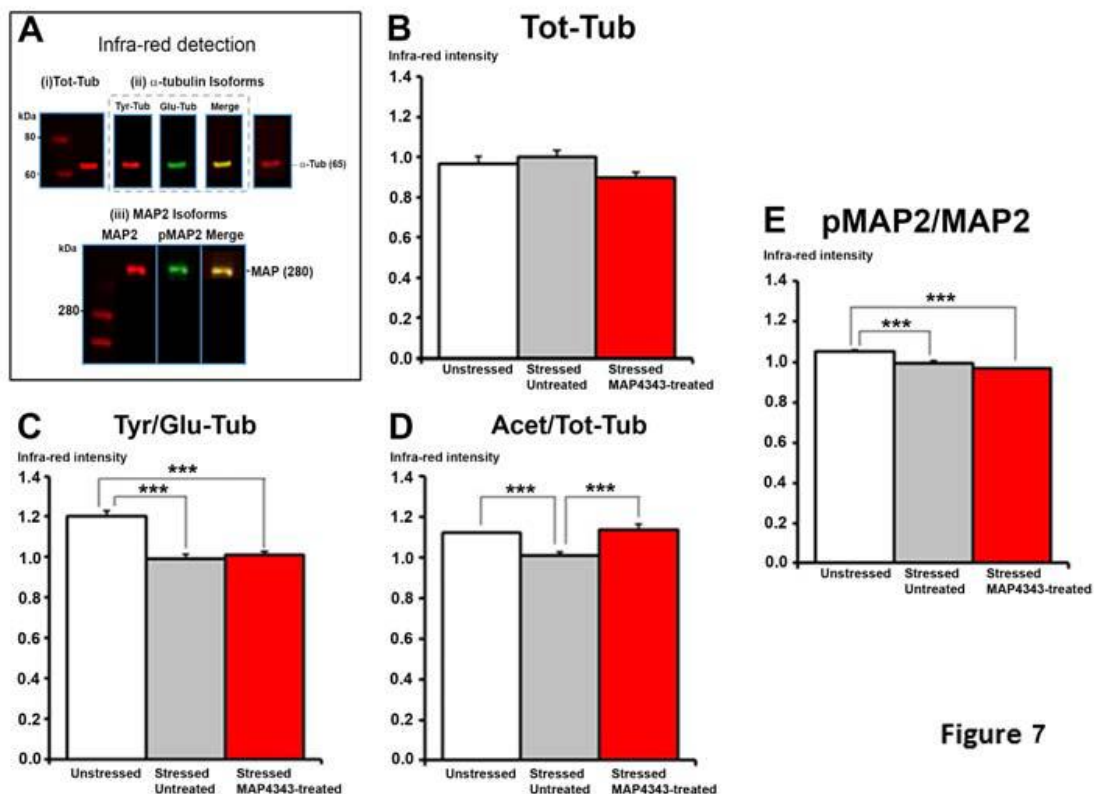


Figure 7

Figure 7: Effect of 4-week administration of MAP4343 on alpha-tubulin and MAP2 isoforms in hippocampi from stressed tree shrews.

A: Representative Western blot showing infrared specific detection of proteins: (i) total α -Tubulin in red (Tot-Tub), (ii) α -tubulin isoforms, i.e. tyrosinated α -Tubulin in red (Tyr-Tub), detyrosinated α -Tubulin in green (Glu-Tub) and acetylated α -Tubulin in red (Acet-Tub) and (iii) MAP2 isoforms i.e. total MAP2 in red (MAP2) and phosphorylated MAP2 in green (pMAP2).

B-E: Histograms showing the Tot-Tub (B), the Tyr/Glu-Tub ratio (C), the Acet/Tot-Tub ratio (D) and the pMAP2/MAP2 ratio in control tree shrews (white bar; “Unstressed” group), in stressed tree shrews receiving vehicle (grey bar; “Stressed, Vehicle” group) or in stressed tree shrews treated with MAP4343 (red bar; “Stressed, MAP4343-treated” group). Data,

expressed as percentage of infrared intensity (B) or ratio of two intensities (C, D, E) are means \pm SEM obtained from independent animals (n=6 per group).

*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 when compared between the indicated groups (Kruskal-Wallis ANOVA, followed by Dunn's post-hoc test).

Table 1: Body weight values measured in stressed tree shrews receiving vehicle or treated with MAP4343

Data, averaged on one week and expressed in grams, are means \pm SEM from independent animals (n=8 per group).

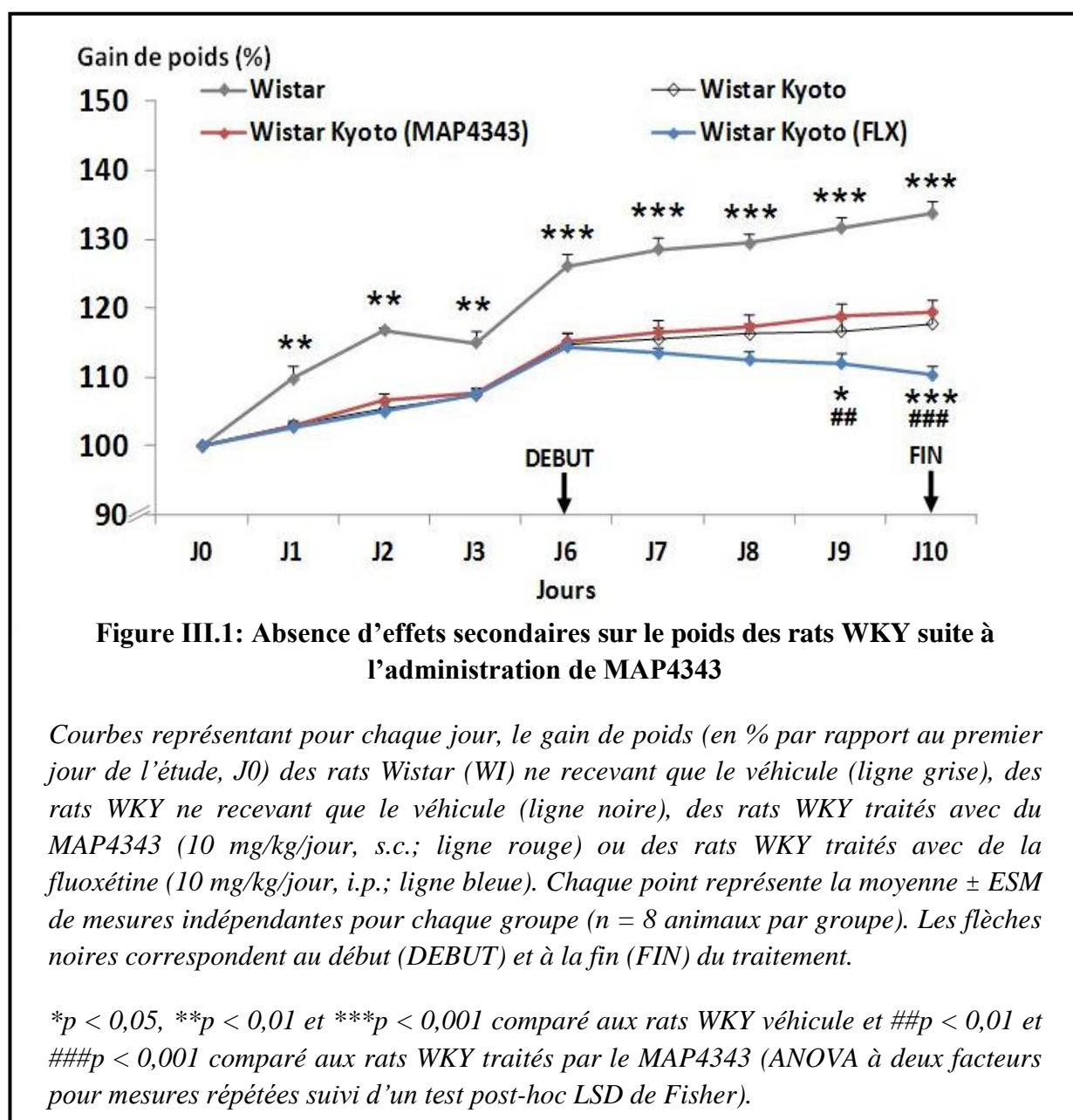
*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, as compared to the value obtained in unstressed control period (Wk 2) for each group.

	Body Weight (g)					
	Week 2	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
Untreated	232.7 \pm 3.3	224.7 \pm 2.7**	228.1 \pm 3.2	226.1 \pm 4.4*	224.6 \pm 5.4**	223.5 \pm 5.5**
MAP4343- treated	228.0 \pm 3.3	213.5 \pm 6.9***	214.1 \pm 7.5***	212.5 \pm 8.3***	216.3 \pm 8.3***	215.7 \pm 8.7***

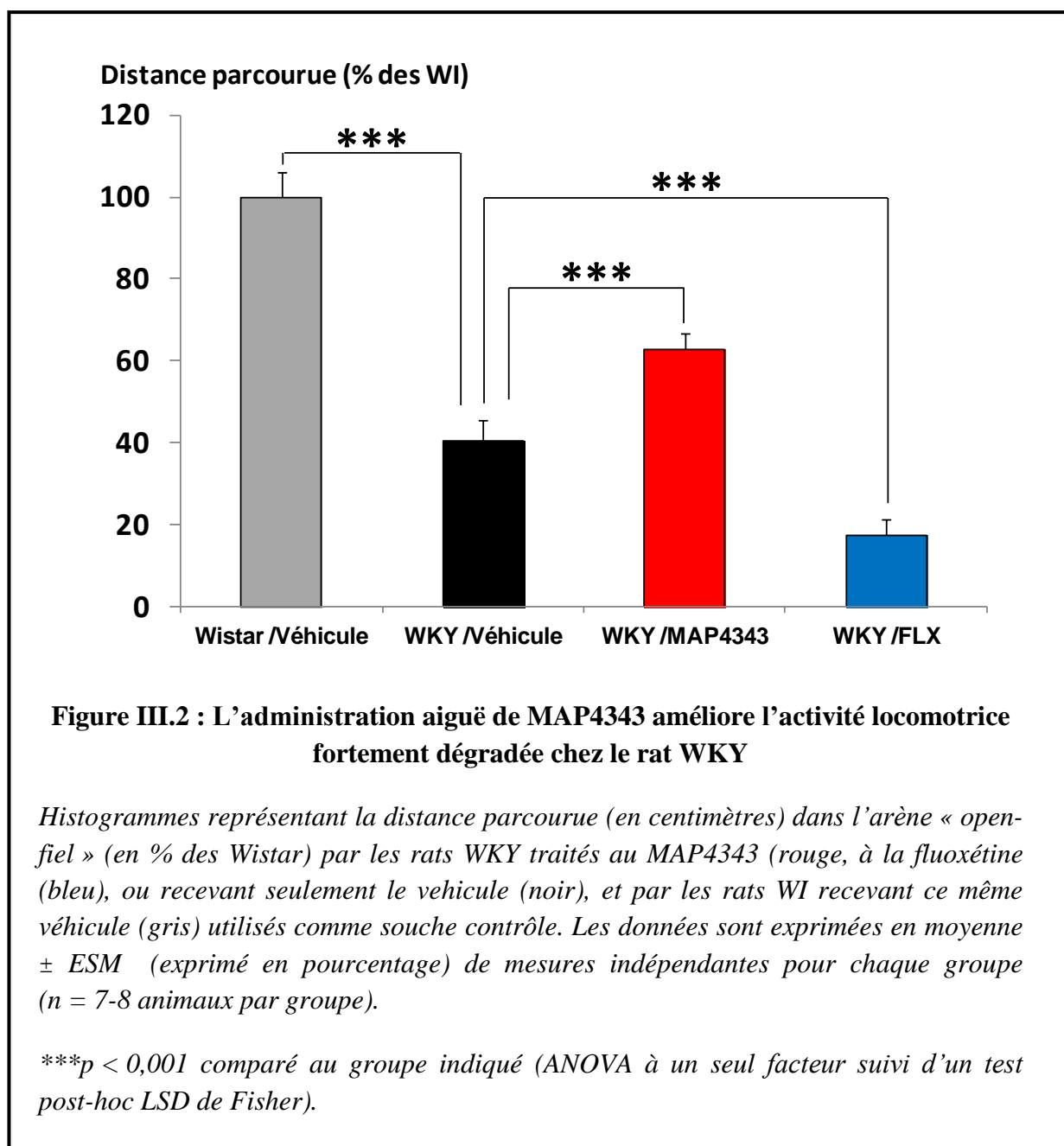
III.2. EFFET DE L'ADMINISTRATION AIGUË DE MAP4343 DANS UN MODÈLE DE TROUBLES DEPRESSIFS INNES, LE RAT WISTAR KYOTO

La lignée de rats Wistar Kyoto (WKY) est un modèle endogène de dépression. En effet, ces rats ont des altérations comportementales et hormonales caractéristiques des modèles de dépression. En particulier, ils montrent une immobilité accrue lors du test de nage forcée. Le MAP4343 a été testé sur cette lignée pour compléter l'étude préclinique de la molécule via un modèle endogène des troubles dépressifs.

III.2.1. Poids corporel



Tous les groupes de rats ont montré une augmentation de leur poids, dans le temps ($F_{9,135} = 511,37$; $p < 0,001$). Cependant, les rats WKY ont présenté un plus faible gain de poids pendant la durée de l'expérience ($F_{18,135} = 19,38$; $p < 0,001$). L'administration de MAP4343 n'a pas modifié le gain de poids des rats WKY par rapport aux rats WKY ne recevant que le véhicule. En revanche, l'administration de fluoxétine a induit une réduction significative du gain de poids au cours des deux derniers jours de traitement, (voir Figure III.1). Ces résultats suggèrent donc que, contrairement à la fluoxétine, le MAP4343 est



dépourvu d'effet anorexigène. Cela confirme les résultats précédemment décrits par Bianchi et Baulieu (2012) dans un modèle d'isolement social chez rat.

III.2.2. Comportement

III.2.2.1. Activité locomotrice

Les rats WKY contrôles ne recevant que le véhicule présentent une plus faible activité locomotrice (60%) que leurs congénères de la souche WI recevant ce même véhicule (*Figure III.2*). L'administration aiguë de MAP4343 chez les rats WKY (10 mg/kg/jour pendant 4 jours, s.c.) a montré une récupération significative de l'activité locomotrice (+56%) par rapport à ceux recevant uniquement le véhicule. En revanche l'administration de fluoxétine a potentialisé la baisse de locomotion observée chez les animaux de cette souche WKY (-40% comparés aux rats WKY ne recevant que le véhicule) (*Figure III.2*).

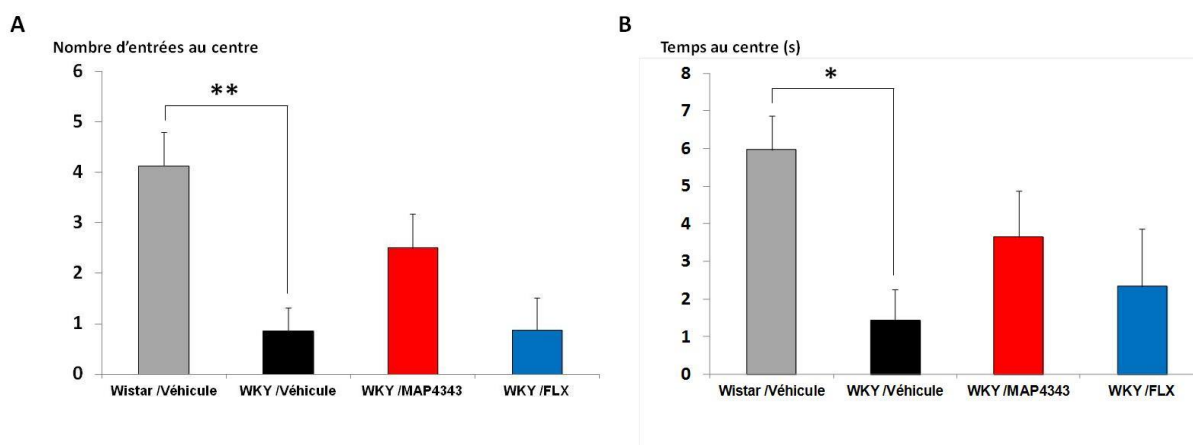


Figure III.3: Effet anxiolytique d'une administration aiguë de MAP4343 chez le rat WKY sur une plateforme de type « open field »

Histogrammes montrant le nombre d'entrées (A) et le temps passé (en secondes) (B) au centre de la plateforme chez les rats WKY traités soit par le MAP4343 (rouge) soit par la fluoxétine (bleu) ou recevant le véhicule (noir), et chez les rats WI (gris) utilisés comme contrôle. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM d'animaux indépendants ($n = 7-8$ par groupe).

** $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$ comparé au groupe indiqué (ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD de Fisher).*

III.2.2.2. Comportement de type « Anxieux »

Parallèlement à la mesure de l'activité locomotrice, le comportement de type « anxieux » a été évalué dans « l'open-field » par la mesure de deux paramètres comportementaux : le nombre d'entrées au centre de la plateforme et le temps passé au centre de la plateforme. Un niveau faible de ces deux paramètres est classiquement associé à un état anxieux chez le rat (Campos et al. 2013). Tout d'abord, les rats WKY témoins, ne recevant que le véhicule, ont montré une forte réduction de ces deux paramètres comparés aux rats de la souche WI recevant ce même véhicule (- 79 % pour le nombre d'entrées et - 65 % pour le temps passé au centre, (Figure III.3). Le traitement par le MAP4343 chez les rats WKY montre ici une récupération de ces deux mesures comportementales puisque les valeurs des mesures des animaux traités ne sont pas statistiquement différentes de celles des animaux de la souche témoin (Figure III.3). Ces résultats suggèrent que le MAP4343 réduit l'état anxieux chez les rats WKY.

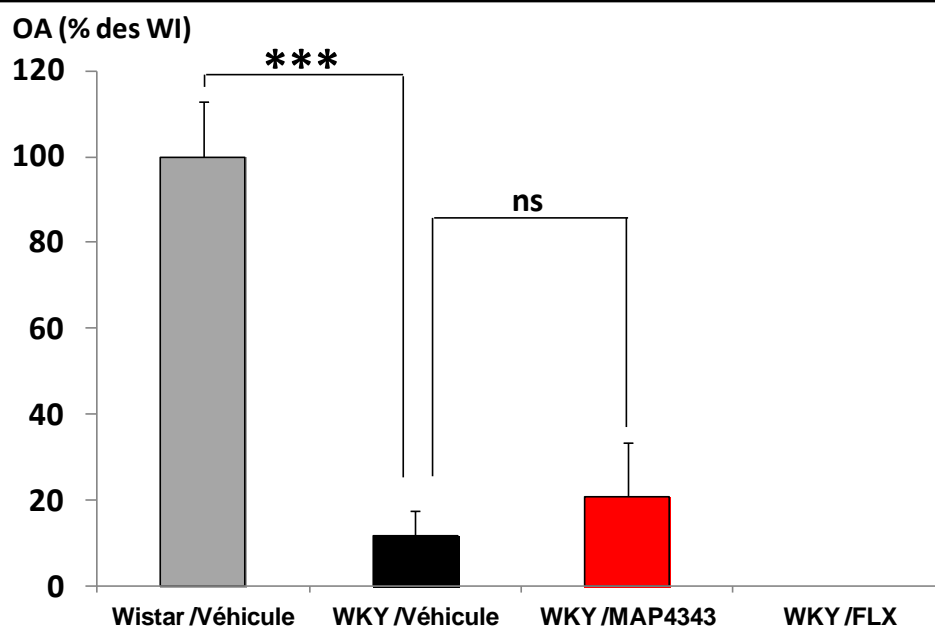


Figure III.4: Effet anxiolytique d'administration aiguë de MAP4343 chez le rat WKY dans le labyrinthe en croix surélevé

Histogramme représentant l'index OA chez les rats WKY traités au MAP4343 (rouge) ou à la fluoxétine (bleu) ou témoins (noir), et chez les rats WI (gris) utilisés comme contrôle. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM d'animaux indépendants ($n = 7-8$ par groupe).

**** $p < 0,001$ comparé au groupe indiqué (ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD de Fisher).*

Lors du test du labyrinthe en croix surélevé, la valeur de l'index OA correspondant à la proportion de temps passée dans les bras ouverts du dispositif est fortement abaissée (- 90 %) chez les rats WKY qui ont reçu le véhicule par rapport aux rats WI témoins qui ont reçu le même véhicule. L'administration de MAP4343 chez les rats WKY a permis une augmentation de 81 % de cet index par rapport à la valeur mesurée chez ces mêmes rats recevant le véhicule (Figure III.4). Cette augmentation n'apparaît cependant pas significative ($p = 0,54$) en raison de la variabilité des mesures. À l'opposé, le traitement par la fluoxétine annule la valeur de cet index (Figure III.4) montrant ainsi une action de type « anxiogénique » d'une

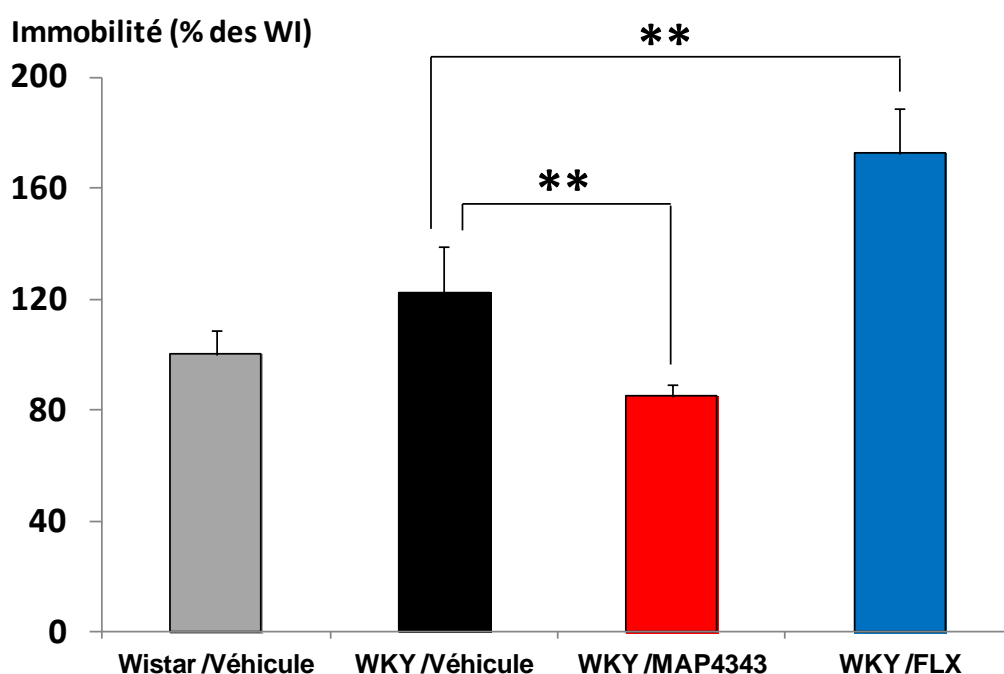


Figure III.5 : Efficacité antidépressive de l'administration aiguë de MAP4343 chez le rat WKY dans le FST

Histogramme représentant le temps d'immobilité dans le FST, mesuré chez les rats WKY traités soit par le MAP4343 (rouge) soit par la fluoxétine (bleu) ou recevant uniquement le véhicule (noir), et chez les rats WI recevant le véhicule (gris) pris comme souche contrôle. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM d'animaux indépendants ($n = 7-8$ par groupe).

*** $p < 0,01$ comparé au groupe indiqué (ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD de Fisher).*

administration aiguë de fluoxétine.

III.2.2.3. État de type « dépressif » évalué dans le test de la nage forcée (FST)

Le test de nage forcée permet d'observer un comportement de type « dépressif » (West 1990). Les animaux WKY recevant le véhicule ont montré une augmentation de 26 % de la durée totale d'immobilité qui n'est cependant pas significative ($p = 0,07$). De façon intéressante, l'administration de MAP4343 chez les rats WKY a réduit significativement leur temps d'immobilité mesuré dans ce test (- 31 %, $p < 0,01$; *Figure III.5*), suggérant l'effet antidépresseur du MAP4343. Au contraire, le traitement aigu par la fluoxétine a provoqué une augmentation du temps d'immobilité. Ce résultat confirme que les rats WKY sont résistants à la fluoxétine, comme précédemment montré (Griebel et al. 1999).

III.2.3. Analyse du système microtubulaire de l'hippocampe par Western Blot

Afin de savoir si le MAP4343 affecte la dynamique microtubulaire chez le rat WKY, une étude par Western blot de quantification relative a été réalisée. Elle concerne la tubuline α tyrosinée (Tyr-Tub) (enrichie dans les microtubules dynamiques), la tubuline α détyrosinée (Glu-Tub) (enrichie dans les microtubules stables), la tubuline α acétylée (Acet-Tub) enrichie dans les microtubules stables et la phosphorylation de MAP2.

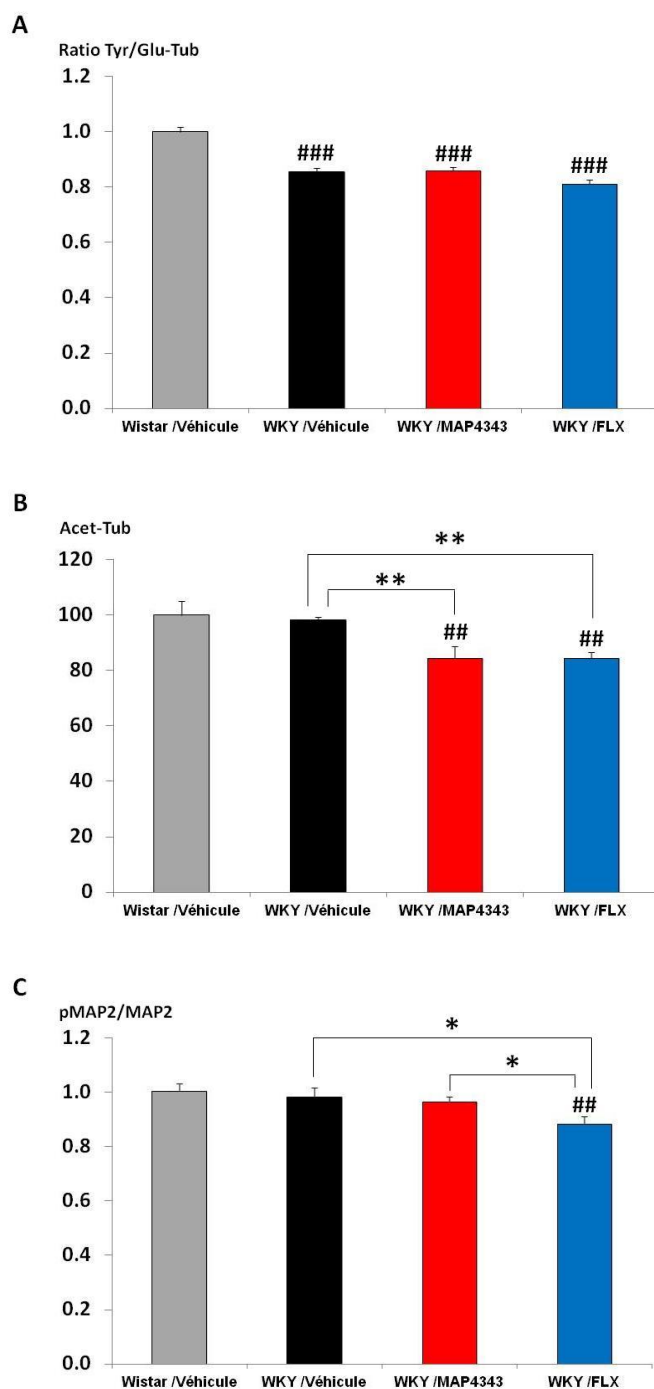


Figure III.6 : Effets de l'administration aiguë de MAP4343 sur le système microtubulaire hippocampique de rats WKY

A-C: Histogrammes montrant l'expression du ratio de tubuline α tyrosinée /tubuline α détyrosinée (Tyr/Glu-Tub) (A), de la tubuline α acétylée (Acet-Tub) (B) et du ratio pMAP2 /MAP2 (C) chez les rats WKY traités soit par le MAP4343 (rouge) soit par la fluoxétine (bleu) ou ne recevant que le véhicule (noir) et chez les rats WI (gris) recevant le véhicule, utilisés comme souche contrôle. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM d'animaux indépendants ($n = 6-8$ par groupe).

* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparé au groupe indiqué et ## $p < 0,01$ et ### $p < 0,001$ comparé aux rats WKY recevant les véhicules (ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc LSD de Fisher).

Le niveau d'expression de la tubuline α totale n'est pas modifié entre les différents groupes de rats (données non présentées). Le ratio Tyr/Glu-Tub, marqueur de dynamique microtubulaire s'est révélé plus faible chez les rats WKY qui ont reçu le véhicule que chez les rats WI témoins, recevant ce même véhicule. Les administrations aiguës de MAP4343 n'ont pas

induit de modifications de ce ratio qui est resté significativement inférieur à celui des animaux contrôles WI (*Figure III.6*). De plus, l'Acet-Tub n'est pas différente d'une lignée à l'autre. Cependant, une diminution significative de l'expression d'Acet-Tub a été mise en évidence chez les rats WKY traités par le MAP4343, tout comme chez ceux traités par la fluoxétine, lorsqu'ils sont comparés aux rats WKY recevant le véhicule (*Figure III.6*). Enfin l'expression de la phosphorylation de MAP2 ne semble pas être différente dans les deux lignées de rats. Il est cependant intéressant de noter que la fluoxétine diminue cette proportion de MAP2 phosphorylée.

IV. DISCUSSION

Les données obtenues montrent l'efficacité antidépressive du MAP4343 sur deux modèles validés utilisant deux espèces différentes et deux types de traitement. Non seulement, la molécule a agi sur le comportement des toupayes, mais elle a aussi permis de limiter les réactions neuroendocriniennes et d'améliorer les perturbations du sommeil induites par le stress. Ces changements physiologiques et comportementaux sont associés aux troubles dépressifs. Ensuite, chez les rats WKY, le MAP4343 a permis d'inhiber en partie le comportement anxio-dépressif dans la plupart des tests expérimentaux utilisés. Enfin, il apparaît que l'action du MAP4343 sur l'expression des protéines microtubulaires est plus complexe que ce qui avait été précédemment décrit (M. Bianchi and Baulieu 2012).

IV.1. EFFET DU STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE SUR LE COMPORTEMENT ET LA PHYSIOLOGIE CHEZ LE TOUPAYE DE BELANGER

Tout d'abord, les altérations comportementales et biologiques observées dans le modèle de stress psychosocial chronique chez le toupaye de Belanger confirment les résultats précédemment obtenus avec ce modèle par d'autres auteurs. En effet, une diminution du poids induite par le stress, de l'ordre de 5 %, est constante dans la littérature (E Fuchs, Jöhren, and Flügge 1993; Eberhard Fuchs 2005). De même, la réduction progressive de l'activité locomotrice, ainsi que le comportement d'évitement face au congénère dominant ont été abondamment décrits (Eberhard Fuchs et al. 1996; M. Kramer, Hiemke, and Fuchs 1999; Van Kampen et al. 2000).

De plus, l'augmentation du taux urinaire de cortisol observée dans cette étude, reflète une hyperactivation de l'axe HHS régulièrement décrite dans ce modèle (Eberhard Fuchs et al. 2001). Ce phénomène a auparavant été décortiqué pour mieux comprendre les altérations de cet axe neuroendocrinien (Jöhren, Flügge, and Fuchs 1994; Eberhard Fuchs et al. 2001; Van

Kampen et al. 2002). Ainsi, chez le toupaye, il a été mis en évidence la similarité des effets d'un stress psychosocial chronique et d'un traitement à long terme avec du cortisol (F Ohi et al. 2000). Le stress psychosocial comme le traitement au cortisol ont induit une diminution du volume de l'hippocampe des animaux. Or, les altérations de l'axe HHS observées chez les patients atteints de troubles dépressifs (Carroll et al. 1981; Florian Holsboer 2001; Carroll et al. 2007) ont été corrélées avec la réduction du volume de l'hippocampe (Goosens and Sapolsky 2007) (*Voir paragraphe 1.1.3.2*). Ces résultats suggèrent donc que les mécanismes induisant les altérations structurales de l'hippocampe dans ce modèle sont similaires à ceux de la pathologie humaine.

De même, l'augmentation du taux urinaire de noradrénaline observée chez les toupayes révèle une hyperactivation du système sympathique. Ce phénomène est impliqué dans la réponse au stress chronique chez l'Homme (Stratakis and Chrousos 1995). En particulier, il est responsable de processus délétères liés au système cardiovasculaire (Austin, Wissmann, and von Kanel 2013) ce qui rend ce modèle d'autant plus intéressant.

L'hyperthermie a déjà été observée chez les toupayes exposés à ce stress psychosocial (Kohlhause et al. 2011). Plus particulièrement, il a été montré une corrélation inverse entre l'hyperthermie et le taux de testostérone urinaire. Puisqu'il est établi dans des modèles animaux que, chez le mâle, la dominance est associée au taux de testostérone circulant (Blanchard et al. 1993), l'hyperthermie pourrait être un marqueur de subordination dans ce modèle. D'autre part l'hyperthermie induite par le stress est une réponse métabolique connue chez l'Homme (Marazziti, Di Muro, and Castrogiovanni 1992) et retrouvée dans des modèles de stress chronique chez le rongeur (Adriaan Bouwknecht, Olivier, and Paylor 2007). Ce phénomène est la conséquence d'une plus grande accessibilité au glucose, et d'une augmentation du rythme cardiaque (Plaut and Friedman 1982). Elle est connue pour ne pas

être due à une augmentation de l'activité physique, ce qui n'est d'ailleurs pas observé ici, mais bien pour être la conséquence d'une régulation centrale (Oka, Oka, and Hori 2001). Elle est caractéristique de la sur-activation du système sympathique (Vinkers et al. 2008) et est à mettre en relation avec les résultats du dosage urinaire de noradrénaline.

Enfin, les altérations du sommeil dans ce modèle n'ont été décrites qu'une seule fois dans une thèse de doctorat (Aue 1988). Il avait été montré une augmentation du nombre et de la longueur des phases de réveil, ce qui est concordant avec la baisse du sommeil total observée dans l'étude présentée dans cette thèse. De plus, le sommeil à onde lente avait été trouvé réduit, ce qui est en accord avec les données récoltées au cours de notre étude. En effet, il a été observé, outre une diminution de la quantité de REM, une tendance à la diminution de la quantité de NREM (données non montrées). Chez les patients atteints de troubles dépressifs il est observé une augmentation du temps de sommeil REM (Steiger et al. 2013). Néanmoins, dans cette étude, la diminution observée du temps de sommeil REM est du même ordre que la diminution du temps de sommeil total. D'ailleurs, la proportion de sommeil REM par rapport au sommeil total ne varie pas significativement (données non montrées). Ces données suggèrent plusieurs hypothèses. D'une part, la mesure par EEG réalisée n'est peut-être pas assez précise pour observer une augmentation de la durée des épisodes de sommeil REM. En effet, les épisodes de sommeil (REM ou NREM) des toupayes sont beaucoup plus courts que chez l'Homme, à savoir de quelques minutes seulement (Coolen et al. 2012). D'autre part, la durée de sommeil total chez le toupaye en laboratoire semble conditionnée par les cycles d'éclairage. En effet, le toupaye montre une proportion de 91 % de sommeil durant la phase sombre et de 30% durant la phase lumineuse ; le temps de sommeil des animaux dans leur environnement naturel n'étant pas connu. Il est fort possible qu'en laboratoire ces

animaux suivent un rythme circadien particulier, pouvant effacer certaines conséquences du stress psychosocial chronique.

IV.2. EFFET ANTIDÉPRESSEUR DU MAP4343 SUR LE STRESS PSYCHOSOCIAL CHRONIQUE CHEZ LE TOUPAYE DE BELANGER

Tout d'abord, le traitement avec le MAP4343 a eu un effet significatif sur le comportement des toupayes stressés. Ainsi, il semble avoir empêché la diminution de l'activité locomotrice induite par le stress. Des effets similaires ont été retrouvés avec un ATC, la clomipramine (Eberhard Fuchs et al. 1996; M. Kramer, Hiemke, and Fuchs 1999; Wang et al. 2013), ainsi qu'avec un antidépresseur atypique comme l'agomélatine (Schmelting et al. 2014a) ou encore avec un antagoniste de récepteurs NK1, le L-760735 (van der Hart *et al.*, 2005). De plus, le MAP4343 semble avoir inhibé le comportement d'évitement des toupayes dominés, comme cela avait été le cas avec la clomipramine (Eberhard Fuchs et al. 1996; M. Kramer, Hiemke, and Fuchs 1999). Le MAP4343 a donc des effets antidépresseurs sur le comportement des toupayes stressés, comparables à ceux d'autres antidépresseurs qui ont été testés.

En revanche, le traitement par le MAP4343 n'a pas montré d'effet négatif sur le poids des animaux. Cela suggérerait une relativement bonne tolérance de la molécule chez cette espèce proche de l'Homme, ce qui constitue un atout par rapport à d'autres molécules antidépressives. Cependant, le traitement avec le MAP4343 ne permet pas d'empêcher la diminution du poids induite par le stress psychosocial chez le toupaye, tout comme d'autres antidépresseurs avérés précédemment testés tels que la fluoxétine et l'agomélatine (Schmelting et al. 2014b).

En effet, les variations du poids sont la résultante de la prise alimentaire et de la dépense d'énergie. Or il a été observé une hyperactivité de l'axe HHS et du système sympathique chez le toupaye soumis au stress psychosocial caractérisé par une augmentation du cortisol et de

l'adrénaline. Ce phénomène, également retrouvé chez les patients atteints de troubles dépressifs (Florian Holsboer 2001; Otte 2005), suggérerait une plus grande dépense énergétique (Myers, McKlveen, and Herman 2014). Or le MAP4343 n'abolit pas totalement l'augmentation de ces hormones pendant le stress, mais permet d'en limiter la progression, voire même d'induire une baisse significative (pour le cortisol) après de trois semaines de traitement. La molécule a donc un effet partiel, mais non-négligeable, sur l'hypersécrétion de ces deux hormones par suite d'un stress. D'ailleurs, un effet similaire sur la réduction du taux urinaire de cortisol a également été montrée avec des traitements par d'autres molécules comme la fluoxétine, l'agomélatine (Schmelting *et al.*, 2014) ou la clomipramine (M. Kramer, Hiemke, and Fuchs 1999; Magariños *et al.* 1996). Mais l'effet de ces drogues est observé plutôt à la quatrième semaine de traitement et n'a pas toujours été reproduit (van der Hart *et al.* 2005). De même, l'action sur le taux urinaire de noradrénaline n'est visible qu'après quatre semaines de traitement avec l'agomélatine (Schmelting *et al.* 2014a) et apparaît très contrastée avec la clomipramine (Kramer *et al.*, 1999; van der Hart *et al.* 2005). Enfin, l'inhibition de l'hyperthermie, observée avec par le MAP4343, a également été enregistrée, de façon similaire avec la fluoxétine et l'agomélatine (Schmelting *et al.* 2014a).

Certes, cette étude ne permet pas de mettre clairement en évidence les mécanismes qui sous-tendent l'effet de type antidépresseur du MAP4343, en particulier au niveau de l'axe HHS. Cependant, une étude récente à montré, *in vitro*, un effet direct sur la transcription du gène humain de la CRH de certains neurostéroïdes tels que la prégénolone. L'étude a consisté à transfecter des cellules Neuro-2A différenciées avec un fragment du promoteur du gène Crh humain associé à un gène rapporteur. La prégénolone, l'alloprégénolone et la tétrahydrodéoxycorticostérone ont inhibé la transcription de ce gène (Budziszewska *et al.* 2010).

Enfin, pour la première fois une molécule ayant des propriétés « antidépressives » dans un modèle pré-clinique a montré des effets sur le sommeil des toupayes soumis au stress psychosocial. Ce résultat est très intéressant puisque non seulement l'effet est observé sur la quantité totale de sommeil et la diminution de sommeil REM sous-jacente, mais également sur l'efficacité du sommeil. Il est important de noter que souvent la seule cause de demande de médication est liée aux altérations du sommeil des patients (*voir paragraphe I. 1.1.3*). Des études ont déjà été réalisées montrant l'effet de divers neurostéroïdes, dont la prégénolone sulfate, sur le sommeil, via l'implication du système cholinergique (Darnaudéry et al. 1999; George et al. 2006).

IV.3. COMPORTEMENT ANXIO-DÉPRESSIF DE LA LIGNÉE DE RATS WISTAR KYOTO

Grâce aux rats Wistar Kyoto, il a été mis en évidence un phénotype anxio-dépressif. En effet, tout d'abord, ils ont montré un gain de poids considérablement réduit comparés aux rats Wistar. Or les rats Wistar Kyoto ont été initialement caractérisés dans la littérature par l'apparition d'ulcères induits par le stress qui sont caractéristiques des problèmes gastriques observés dans les troubles dépressifs (W. P. Paré 1989; W. P. Paré and Redei 1993). De plus, l'activité locomotrice réduite ou encore le comportement de type anxieux observés dans « *l'open-field* » ainsi que dans le labyrinthe en croix surélevé sont des comportements déjà décrits chez cette souche de rats (Durand et al. 1999; Griebel et al. 1999), caractéristiques des modèles de troubles anxio-dépressifs. Enfin, le temps d'immobilité accru dans le test de nage forcée est considéré comme un paramètre de référence pour la validation pré-clinique de molécule ayant un potentiel antidépresseur. La réponse particulière et spontanée des rats Wistar Kyoto dans ce test est, au contraire, une augmentation de l'immobilité (Lahmame and Armario 1996; López-Rubalcava and Lucki 2000), ce qui suggère un comportement de type « dépressif » chez cette lignée de rats. Dans l'étude présentée ici, l'effet de la lignée Wistar

Kyoto sur l'immobilité était léger. Cela peut s'expliquer par le fait que le test du FST a eu lieu après quatre jours de tests comportementaux. Or, les rats Wistar Kyoto sont très sensibles aux événements stressants (O'Mahony et al. 2011), ainsi, leur comportement peut avoir été modifié par les tests qu'ils ont subis avant le FST.

Les altérations éventuelles de l'axe HHS ou du système sympathique n'ont pas été vérifiées, ici. Cependant, il est décrit dans la littérature, chez ces rats, une augmentation du taux plasmatique d'ACTH à la suite d'un événement stressant (Pardon, Ma, and Morilak 2003; W. P. Paré and Redei 1993). De plus, il a été montré dans deux études un volume réduit de l'hippocampe (Tizabi et al. 2010; Cominski et al. 2014). Ces données physiologiques et anatomiques confortent ainsi l'existence d'un phénotype de type « dépressif » de cette lignée de rats.

IV.4. EFFET ANTIDÉPRESSEUR DU MAP4343 SUR LA LIGNÉE DE RAT WISTAR KYOTO

Comme dans le modèle de stress psychosocial chronique, le MAP4343 n'a pas agi sur le poids des animaux. La fluoxétine, en revanche, a réduit le gain de poids à la fin du traitement comme précédemment décrit dans la littérature (Durand et al. 1999). De plus, le MAP4343 a augmenté l'activité locomotrice spontanée des animaux. Ce résultat confirme l'effet obtenu sur le comportement du toupaye de Belanger.

Les effets du MAP4343 sur le comportement de type « anxieux » des rats WKY sont contrastés, mais indique une réduction de l'anxiété mesurée chez ces animaux. Lorsque les WKY sont traités par le MAP4343, le temps passé dans le centre de « *l'open field* » n'est plus significativement réduit par rapport aux Wistar suggérant que le traitement réduit la différence comportementale entre les deux souches. L'effet du traitement sur l'OA index montre

également un effet de type « anxiolytique », mais celui-ci n'apparaît pas significatif dans ce test.

Contrairement au MAP4343, la fluoxétine n'a pas permis de réduire significativement les différences comportementales entre les rats WKY et Wistar dans le test de « *l'open field* ». Au contraire, elle engendre une activité nulle dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé, signe d'une forte activité de type anxiogénique. Une étude précédente a montré un effet plus contrasté de la fluoxétine dans le test du labyrinthe en croix surélevé chez ces animaux. Ainsi une action anxiogénique a été observée 30 minutes après une injection aiguë et, de façon surprenante une action anxiolytique 24 h après cette injection (Griebel et al. 1999). En revanche, l'administration chronique de fluoxétine n'a pas relevé d'efficacité sur le comportement anxieux de ces animaux (Durand et al. 1999). Nos résultats confirment une action anxiogénique de la fluoxétine chez ces animaux lors d'un traitement aigu.

Enfin, le MAP4343 diminue significativement l'immobilité dans le FST alors que la fluoxétine l'augmente. En effet, il a été montré chez le rat Wistar Kyoto, qu'un traitement à la fluoxétine aigu ou chronique ne réduit pas l'immobilité dans le FST (Griebel et al. 1999; López-Rubalcava and Lucki 2000).

Le rat Wistar Kyoto possède une résistance aux ISRS dans le test de nage forcée qui n'est pas strictement retrouvée dans l'EPM (Griebel et al. 1999). Ainsi, nous montrons ici que le MAP4343 est efficace sur un modèle résistant aux ISRS. Les phénomènes biologiques qui sous-tendent cette résistance ne sont pas élucidés. Cependant il a été montré que la souche n'était pas autant résistante à la désipramine dans le FST, puisqu'elle y réduit l'immobilité des animaux après 12 jours de traitement ou bien après 2 injections successives (W. P. Paré and Redei 1993; Tejani-Butt, Kluczynski, and Paré 2003). Ce résultat révèle une résistance spécifique et stricte de la souche aux ISRS, ce qui suggère l'implication du système

sérotoninergique dans ce phénomène de résistance. L'action du MAP4343 ne semble donc pas être empêchée par cette spécificité, ce qui renforce l'idée que l'effet de type antidépresseur de notre molécule est original et indépendant des systèmes monoaminergiques.

IV.5. MODULATION DU SYSTÈME MICROTUBULAIRE DE L'HIPPOCAMPE DANS LES DEUX MODÈLES DE DÉPRESSION

Tout d'abord, l'expression de tubuline α totale n'apparaît pas modifiée dans les deux modèles étudiés au cours de ce travail de thèse, à savoir le stress psychosocial chez le toupaye et la souche de rats Wistar Kyoto.

En revanche, des modifications de l'expression des isoformes de la protéine produites lors de modifications post-traductionnelles ont été observées. Ainsi la valeur du ratio Tyr/Glu-Tub est diminuée chez le toupaye stressé, tout comme chez le rat Wistar Kyoto. Ce ratio, qui reflète l'expression de tubuline α tyrosinée (Tyr-Tub) par rapport à l'expression de tubuline α détyrosinée (Glu-Tub), a une valeur plus faible en raison de la baisse de l'expression de la tubuline α tyrosinée. Ce même phénomène avait été observé précédemment dans l'isolement social après le sevrage (M. Bianchi and Baulieu 2012). De même, une diminution de la Tyr-Tub avait été observé suite à un stress de contention (Massimiliano Bianchi, Heidbreder, and Crespi 2003) et suite à un stress chronique imprédictible (Yang et al. 2009). La baisse du ratio Tyr/Glu-Tub semble un bon marqueur de troubles dépressifs puisque ce phénomène apparaît dans les deux modèles testés ici, confirmant ainsi les données précédemment décrites dans d'autres modèles.

L'expression de la tubuline α acétylée est moindre chez les toupayes stressés. Cependant, elle n'est pas plus faible dans la souche Wistar Kyoto que dans la souche Wistar. Dans le modèle d'isolement social après sevrage chez le rat Sprague Dawley, il fut observé au contraire une augmentation (non significative cependant) de cette isoforme de tubuline dans l'hippocampe

((M. Bianchi and Baulieu 2012), alors que dans l'amygdale elle fut réduite, et non modifiée dans le cortex préfrontal. Dans le modèle d'isolement social chez le rat Lister Hooded, aucune modification dans l'expression de tubuline α acétylée ne fut observée (M. Bianchi et al. 2006). La modulation de tubuline α acétylée apparaît donc très variable en fonction de la structure étudiée, du modèle animal utilisé, voire même de l'espèce.

Il serait intéressant de tester d'éventuelles modifications cellulaires structurales associées à ce changement microtubulaire de l'hippocampe et plus particulièrement des altérations synaptiques pouvant être impliquées dans les troubles dépressifs.

Par ailleurs, une diminution de la proportion de MAP2 phosphorylée est observée chez les toupayes stressés : cette baisse n'est pas retrouvée chez les rats Wistar Kyoto. La phosphorylation de MAP2 régule sa fixation au microtubule (Avila, Domínguez, and Díaz-Nido 1994; MacRae 1997) et semble cruciale pour le maintien de l'intégrité des microtubules et pour la formation des dendrites (Sánchez, Díaz-Nido, and Avila 2000; Dehmelt and Halpain 2005). Ici, la phosphorylation détectée par l'anticorps est située sur la sérine 136 localisée en partie C-terminale, au niveau du site de fixation de MAP2 au microtubule (Sánchez, Díaz-Nido, and Avila 2000). Il est donc possible que la diminution de la phosphorylation de MAP2 favorise son attachement aux microtubules et donc leur stabilité. Ceci restant bien entendu hypothétique dans la mesure où le rôle des nombreuses phosphorylations de MAP2 est loin d'être totalement éclairci (Hernández, Wandosell, and Avila 1987; Sánchez, Díaz-Nido, and Avila 2000).

IV.6. EFFET DU MAP4343 SUR LE SYSTÈME MICROTUBULAIRE HIPPOCAMPIQUE DANS LES DEUX MODÈLES UTILISÉS

Contrairement aux données précédemment décrites, le MAP4343 ne semble pas ici annuler la baisse du rapport Tyr/Glu-Tub observée dans les deux modèles de dépression que nous avons

utilisés. En revanche, notre composé semble avoir un effet spécifique sur la tubuline α acétylée chez le toupaye qui consiste à annuler la baisse de son expression observée à la suite du stress psychosocial. Cependant, l'expression de la tubuline α acétylée n'est pas différente entre le Wistar et le Wistar Kyoto et la MAP4343 induit au contraire une diminution de cette isoforme dans ce modèle. Il avait été montré précédemment que l'expression de cette isoforme de tubuline était significativement réduite dans l'amygdale de rat ayant subi un isolement social après le sevrage et que le MAP4343 supprimait cette diminution (M. Bianchi and Baulieu 2012).

L'ensemble de ces résultats d'analyses par Western-Blot montre que l'action du MAP4343 sur l'expression des différentes modifications post-traductionnelles de la tubuline α n'est pas reproductible en fonction du modèle utilisé. Ces résultats ne sont pas suffisants pour élucider *in vivo*, le mécanisme d'action du MAP4343 sur le système microtubulaire dans l'hippocampe. Il serait intéressant de tester par des expériences *in vitro* si la fixation du MAP4343 à MAP2 a un effet direct sur la phosphorylation de MAP2 et sur les modifications post-traductionnelles de la tubuline α . De même, il serait intéressant d'observer son action sur l'expression de marqueurs de plasticité neuronale.

V. CONCLUSION

Ce travail de thèse a permis de conclure à un effet de type antidépresseur du MAP4343, confirmant ainsi les précédents résultats décrits par Bianchi et Baulieu (2012). Cette efficacité apparaît robuste puisqu'elle est mise en évidence dans deux modèles distincts de dépression, utilisant deux espèces différentes.

Ainsi, le MAP4343 permet d'améliorer les désordres comportementaux, hormonaux et physiologiques observés dans un modèle de troubles dépressifs utilisant le toupaye, une espèce proche du primate. Ces effets positifs sont mis en évidence soit dès le début du protocole de stress ou plus tardivement dans notre protocole de stress chronique. Les résultats sont originaux comme ceux obtenus sur le sommeil ou l'hyperthermie et convergent vers une efficacité de type antidépresseur du MAP4343. De plus, la molécule est efficace sur la souche de rat Wistar Kyoto, un modèle endogène de dépression résistant à certains antidépresseurs conventionnels, en particulier les ISRS. Enfin, chez ces deux espèces éloignées, le produit ne montre pas d'effets secondaires visibles comme la perte de poids. Cependant, son mode d'action via le système microtubulaire n'est pas totalement élucidé, mais l'étude présentée ici, permet d'envisager deux marqueurs : le ratio « Tyr/Glu-Tub » qui semble systématiquement réduit dans les modèles de dépression et le niveau d'acétylation de la tubuline α qui peut être lié à l'action de la molécule. Des études supplémentaires sont nécessaires pour établir un lien direct entre ces deux marqueurs et les altérations structurales observées dans les troubles dépressifs ainsi que pour mieux comprendre le mode d'action de la molécule.

VI. ABRÉVIATIONS

ACTH : Hormone corticotrope ou adrénocorticotropine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATC : antidépresseur tricyclique

CRF ou CRH (Corticotropin Releasing Factor ou Hormone) : corticolibérine

DAT : transporteur de la dopamine

DHEA : dihydroépiandrostérone

EEG : électro-encéphalogramme

EPM (Elevated Plus Maze) : labyrinthe en croix surélevé

FST : test de nage forcée (Forced Swimming Test)

GABA : acide γ -aminobutyrique

GDP :guanosine diphosphate

GTP : guanosine triphosphate

GR : récepteur aux glucocorticoïdes de faible affinité

HDAC : histone déacétylase

HEC : hydroxyéthylcellulose

HHS : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

IMAO : inhibiteur des monoamines oxydases

ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine

ISRN : inhibiteur sélectif de la recapture de la noradrénaline

LC : locus coeruleus

LMA : activité locomotrice (Locomotor Activity)

MAP : *Microtubules Associated Protein*, protéine associée aux microtubules

MAP2 : *Microtubules Associated Protein-2*, protéine associée aux microtubules de type 2

MR : récepteur aux minéralocorticoïdes de forte affinité

NET : transporteur de la noradrénaline

OA : indice d'anxiété (Open Arm index)

PBS : solution tampon salin (Phosphate Buffered Saline)

PREG : prégnénolone

PROG : progestérone

PVN : Noyau Paraventriculaire de l'hypothalamus

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SERT ou 5-HTT: transporteur de la sérotonine

Tph2 : tryptophane hydroxylase-2

WI : Rats de la souche Wistar

WKY : Rats de la souche Wistar Kyoto

VII. RÉFÉRENCES

- Adriaan Bouwknecht, J., Berend Olivier, and Richard E. Paylor. 2007. "The Stress-Induced Hyperthermia Paradigm as a Physiological Animal Model for Anxiety: A Review of Pharmacological and Genetic Studies in the Mouse." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Neurogenetics and Behavior, 31 (1): 41–59. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.02.002.
- Adrien, Joëlle. 2002. "Neurobiological Bases for the Relation between Sleep and Depression." *Sleep Medicine Reviews* 6 (5): 341–51. doi:10.1053/smr.2001.0200.
- Akella, Jyothi S., Dorota Wloga, Jihyun Kim, Natalia G. Starostina, Sally Lyons-Abbott, Naomi S. Morrisette, Scott T. Dougan, Edward T. Kipreos, and Jacek Gaertig. 2010. "MEC-17 Is an α -Tubulin Acetyltransferase." *Nature* 467 (7312): 218–22. doi:10.1038/nature09324.
- Alexander, Brian, Jennifer Warner-Schmidt, Therese M. Eriksson, Carol Tamminga, Margarita Arango-Lievano, Subroto Ghose, Mary Vernov, et al. 2010. "Reversal of Depressed Behaviors by p11 Gene Therapy in the Nucleus Accumbens." *Science Translational Medicine* 2 (54): 54ra76. doi:10.1126/scitranslmed.3001079.
- American Psychiatric Association. 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition: DSM-IV-TR®*. American Psychiatric Pub.
- Amin, Zenab, Graeme F. Mason, Idil Cavus, John H. Krystal, Douglas L. Rothman, and C. Neill Epperson. 2006. "The Interaction of Neuroactive Steroids and GABA in the Development of Neuropsychiatric Disorders in Women." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 84 (4): 635–43. doi:10.1016/j.pbb.2006.06.007.
- Anacker, C., P. A. Zunszain, A. Cattaneo, L. A. Carvalho, M. J. Garabedian, S. Thuret, J. Price, and C. M. Pariante. 2011. "Antidepressants Increase Human Hippocampal Neurogenesis by Activating the Glucocorticoid Receptor." *Molecular Psychiatry* 16 (7): 738–50. doi:10.1038/mp.2011.26.
- Andrade, Laura, Jorge J Caraveo-Anduaga, Patricia Berglund, Rob V Bijl, Ron De Graaf, Wilma Vollebergh, Eva Dragomirecka, et al. 2003. "The Epidemiology of Major Depressive Episodes: Results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys." *International Journal of Methods in Psychiatric Research* 12 (1): 3–21.
- Anisman, Hymie, Lisheng Du, Mikos Palkovits, Gabor Faludi, Gabor G. Kovacs, Peter Szontagh-Kishazi, Zul Merali, and Michael O. Poulter. 2008. "Serotonin Receptor Subtype and p11 mRNA Expression in Stress-Relevant Brain Regions of Suicide and Control Subjects." *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN* 33 (2): 131.

- Anis, N. A., S. C. Berry, N. R. Burton, and D. Lodge. 1983. "The Dissociative Anaesthetics, Ketamine and Phencyclidine, Selectively Reduce Excitation of Central Mammalian Neurones by N-Methyl-Aspartate." *British Journal of Pharmacology* 79 (2): 565–75.
- Arango, V, M D Underwood, A V Gubbi, and J J Mann. 1995. "Localized Alterations in Pre- and Postsynaptic Serotonin Binding Sites in the Ventrolateral Prefrontal Cortex of Suicide Victims." *Brain Research* 688 (1-2): 121–33.
- Arfken, C. L., A. Joseph, G. R. Sandhu, T. Roehrs, A. B. Douglass, and N. N. Boutros. 2014. "The Status of Sleep Abnormalities as a Diagnostic Test for Major Depressive Disorder." *Journal of Affective Disorders* 156 (March): 36–45. doi:10.1016/j.jad.2013.12.007.
- Åsberg M, Träskman L, and Thorén P. 1976. "5-Hiaa in the Cerebrospinal Fluid: A Biochemical Suicide Predictor?" *Archives of General Psychiatry* 33 (10): 1193–97. doi:10.1001/archpsyc.1976.01770100055005.
- Aue, Dirk. 1988. "Konfrontationen zwischen männlichen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*): Konsequenzen der Sozialkontakte für Verhalten und Physiologie sowie der Einfluss individueller und äusserer Faktoren auf die Dominanzentscheidungen." [S.I].
- Austin, Anthony W., Thomas Wissmann, and Roland von Kanel. 2013. "Stress and Hemostasis: An Update." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 39 (8): 902–12. doi:10.1055/s-0033-1357487.
- Avila, J, J Domínguez, and J Díaz-Nido. 1994. "Regulation of Microtubule Dynamics by Microtubule-Associated Protein Expression and Phosphorylation during Neuronal Development." *The International Journal of Developmental Biology* 38 (1): 13–25.
- Ayd, F. J., and B. Blackwell. 1970. "Discoveries in Biological Psychiatry."
- Baas, P. W., and M. M. Black. 1990. "Individual Microtubules in the Axon Consist of Domains That Differ in Both Composition and Stability." *The Journal of Cell Biology* 111 (2): 495–509. doi:10.1083/jcb.111.2.495.
- Bale, Tracy L. 2006. "Stress Sensitivity and the Development of Affective Disorders." *Hormones and Behavior* 50 (4): 529–33. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.06.033.
- Barra, H. S., C. A. Arce, J. A. Rodríguez, and R. Caputto. 1974. "Some Common Properties of the Protein That Incorporates Tyrosine as a Single Unit and the Microtubule Proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 60 (4): 1384–90.
- Baulieu, E. E. 1997. "Neurosteroids: Of the Nervous System, by the Nervous System, for the Nervous System." *Recent Progress in Hormone Research* 52: 1–32.
- Baxter LR, Jr, Schwartz JM, Phelps ME, and et al. 1989. "REduction of Prefrontal Cortex Glucose Metabolism Common to Three Types of Depression." *Archives of General Psychiatry* 46 (3): 243–50. doi:10.1001/archpsyc.1989.01810030049007.
- Belozertseva, I. V., T. Kos, P. Popik, W. Danysz, and A. Y. Beshpalov. 2007. "Antidepressant-like Effects of mGluR1 and mGluR5 Antagonists in the Rat Forced Swim and the

- Mouse Tail Suspension Tests.” *European Neuropsychopharmacology* 17 (3): 172–79. doi:10.1016/j.euroneuro.2006.03.002.
- Benca RM, Obermeyer WH, Thisted RA, and Gillin J. 1992. “Sleep and Psychiatric Disorders: A Meta-Analysis.” *Archives of General Psychiatry* 49 (8): 651–68. doi:10.1001/archpsyc.1992.01820080059010.
- Bench, C. J., K. J. Friston, R. G. Brown, L. C. Scott, R. S. Frackowiak, and R. J. Dolan. 1992. “The Anatomy of Melancholia--Focal Abnormalities of Cerebral Blood Flow in Major Depression.” *Psychological Medicine* 22 (3): 607–15.
- Bétry, C., D. Overstreet, N. Haddjeri, A. L. Pehrson, C. Bundgaard, C. Sanchez, and A. Mørk. 2015. “A 5-HT₃ Receptor Antagonist Potentiates the Behavioral, Neurochemical and Electrophysiological Actions of an SSRI Antidepressant.” *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 131 (April): 136–42. doi:10.1016/j.pbb.2015.02.011.
- Bhatt, Shvetank, Radhakrishnan Mahesh, Ankur Jindal, and Thangaraj Devadoss. 2014. “Neuropharmacological Effect of Novel 5-HT₃ Receptor Antagonist, N-N-Propyl-3-Ethoxyquinoxaline-2-Carboxamide (6n) on Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Molecular and Cellular Response: Behavioural and Biochemical Evidences.” *Pharmacological Reports: PR* 66 (5): 804–10. doi:10.1016/j.pharep.2014.05.002.
- Bianchi, Massimiliano, Kevin C. F. Fone, Ajit J. Shah, Alan R. Atkins, Lee A. Dawson, Christian A. Heidbreder, Jim J. Hagan, and Charles A. Marsden. 2009. “Chronic Fluoxetine Differentially Modulates the Hippocampal Microtubular and Serotonergic System in Grouped and Isolation Reared Rats.” *European Neuropsychopharmacology* 19 (11): 778–90. doi:10.1016/j.euroneuro.2009.06.005.
- Bianchi, Massimiliano, Christian Heidbreder, and Francesco Crespi. 2003. “Cytoskeletal Changes in the Hippocampus Following Restraint Stress: Role of Serotonin and Microtubules.” *Synapse* 49 (3): 188–94. doi:10.1002/syn.10230.
- Bianchi, Massimiliano, Ajit J. Shah, Kevin C.F. Fone, Alan R. Atkins, Lee A. Dawson, Christian A. Heidbreder, Mark E. Hows, Jim J. Hagan, and Charles A. Marsden. 2009. “Fluoxetine Administration Modulates the Cytoskeletal Microtubular System in the Rat Hippocampus.” *Synapse* 63 (4): 359–64. doi:10.1002/syn.20614.
- Bianchi, M., and E.-E. Baulieu. 2012. “3-Methoxy-Pregnenolone (MAP4343) as an Innovative Therapeutic Approach for Depressive Disorders.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (5): 1713–18. doi:10.1073/pnas.1121485109.
- Bianchi, M., K. F. C. Fone, N. Azmi, C. A. Heidbreder, J. J. Hagan, and C. A. Marsden. 2006. “Isolation Rearing Induces Recognition Memory Deficits Accompanied by Cytoskeletal Alterations in Rat Hippocampus.” *European Journal of Neuroscience* 24 (10): 2894–2902. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05170.x.
- Biver, Françoise, Serge Goldman, Véronique Delvenne, André Luxen, Viviane De Maertelaer, Philippe Hubain, Julien Mendlewicz, and Françoise Lotstra. 1994. “Frontal and Parietal Metabolic Disturbances in Unipolar Depression.” *Biological Psychiatry* 36 (6): 381–88. doi:10.1016/0006-3223(94)91213-0.

- Blackwell, B., and L. A. Mabbitt. 1965. "Tyramine in Cheese Related to Hypertensive Crises After Monoamine-Oxidase Inhibition." *Lancet* 1 (7392): 938–40.
- Blanchard, D C, R R Sakai, B McEwen, S M Weiss, and R J Blanchard. 1993. "Subordination Stress: Behavioral, Brain, and Neuroendocrine Correlates." *Behavioural Brain Research* 58 (1-2): 113–21.
- Blier, P., C. de Montigny, and Y. Chaput. 1990. "A Role for the Serotonin System in the Mechanism of Action of Antidepressant Treatments: Preclinical Evidence." *The Journal of Clinical Psychiatry* 51 Suppl (April): 14–20; discussion 21.
- Blier, Pierre, and Claude de Montigny. 1999. "Serotonin and Drug-Induced Therapeutic Responses in Major Depression, Obsessive–Compulsive and Panic Disorders." *Neuropsychopharmacology* 21 (S1): 91S – 98S. doi:10.1016/S0893-133X(99)00036-6.
- Blier, P., and C. De Montigny. 1983. "Electrophysiological Investigations on the Effect of Repeated Zimelidine Administration on Serotonergic Neurotransmission in the Rat." *The Journal of Neuroscience* 3 (6): 1270–78.
- Bloch, Robert G., Alfred S. Dooneief, Abraham S. Buchberg, and Stanley Spellman. 1954. "Clinical Effect of Isoniazid and Ipromniazid in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis." *Annals of Internal Medicine* 40 (5): 881–900. doi:10.7326/0003-4819-40-5-881.
- Booij, Linda, Dongsha Wang, Méliissa L. Lévesque, Richard E. Tremblay, and Moshe Szyf. 2013. "Looking beyond the DNA Sequence: The Relevance of DNA Methylation Processes for the Stress–diathesis Model of Depression." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1615): 20120251. doi:10.1098/rstb.2012.0251.
- Boothman, L, J Raley, F Denk, E Hirani, and T Sharp. 2006. "In Vivo Evidence That 5-HT_{2C} Receptors Inhibit 5-HT Neuronal Activity via a GABAergic Mechanism." *British Journal of Pharmacology* 149 (7): 861–69. doi:10.1038/sj.bjp.0706935.
- Bortolozzi, A., A. Castañé, J. Semakova, N. Santana, G. Alvarado, R. Cortés, A. Ferrés-Coy, et al. 2012. "Selective siRNA-Mediated Suppression of 5-HT_{1A} Autoreceptors Evokes Strong Anti-Depressant-like Effects." *Molecular Psychiatry* 17 (6): 612–23. doi:10.1038/mp.2011.92.
- Boulle, F., D. L. A. van den Hove, S. B. Jakob, B. P. Rutten, M. Hamon, J. van Os, K.-P. Lesch, L. Lanfumey, H. W. Steinbusch, and G. Kenis. 2012. "Epigenetic Regulation of the BDNF Gene: Implications for Psychiatric Disorders." *Molecular Psychiatry* 17 (6): 584–96. doi:10.1038/mp.2011.107.
- Bremner, J. Douglas, Meena Vythilingam, Eric Vermetten, Ahsan Nazeer, Jahangir Adil, Sarfraz Khan, Lawrence H. Staib, and Dennis S. Charney. 2002. "Reduced Volume of Orbitofrontal Cortex in Major Depression." *Biological Psychiatry* 51 (4): 273–79.
- Bromet, Evelyn, Laura Helena Andrade, Irving Hwang, Nancy A Sampson, Jordi Alonso, Giovanni de Girolamo, Ron de Graaf, et al. 2011. "Cross-National Epidemiology of

- DSM-IV Major Depressive Episode.” *BMC Medicine* 9: 90. doi:10.1186/1741-7015-9-90.
- Brown, A., Y. Li, T. Slaughter, and M. M. Black. 1993. “Composite Microtubules of the Axon: Quantitative Analysis of Tyrosinated and Acetylated Tubulin along Individual Axonal Microtubules.” *Journal of Cell Science* 104 (2): 339–52.
- Brown, A., T. Slaughter, and M. M. Black. 1992. “Newly Assembled Microtubules Are Concentrated in the Proximal and Distal Regions of Growing Axons.” *The Journal of Cell Biology* 119 (4): 867–82.
- Brown, E. Sherwood, John Park, Christine E. Marx, Linda S. Hynan, Claire Gardner, Domingo Davila, Alyson Nakamura, Prabha Sunderajan, Alexander Lo, and Traci Holmes. 2014. “A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pregnenolone for Bipolar Depression.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (12): 2867–73. doi:10.1038/npp.2014.138.
- Budziszewska, Bogusława, Anna Zajac, Agnieszka Basta-Kaim, Monika Leśkiewicz, Małgorzata Steczkowska, Władysław Lasoń, and Marek Kaciński. 2010. “Effects of Neurosteroids on the Human Corticotropin-Releasing Hormone Gene.” *Pharmacological Reports: PR* 62 (6): 1030–40.
- Caceres, A, G Banker, O Steward, L Binder, and M Payne. 1984. “MAP2 Is Localized to the Dendrites of Hippocampal Neurons Which Develop in Culture.” *Brain Research* 315 (2): 314–18.
- Calabrese, Francesca, Raffaella Molteni, Giorgio Racagni, and Marco A. Riva. 2009. “Neuronal Plasticity: A Link between Stress and Mood Disorders.” *Psychoneuroendocrinology, Neuroactive Steroids: Effects And Mechanisms Of Action*, 34, Supplement 1 (December): S208–16. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.05.014.
- Campos, Alline C., Manoela V. Fogaça, Daniele C. Aguiar, and Francisco S. Guimarães. 2013. “Animal Models of Anxiety Disorders and Stress.” *Revista Brasileira De Psiquiatria (São Paulo, Brazil: 1999)* 35 Suppl 2: S101–11. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139.
- Caron, J. M. 1997. “Posttranslational Modification of Tubulin by Palmitoylation: I. In Vivo and Cell-Free Studies.” *Molecular Biology of the Cell* 8 (4): 621.
- Carroll, B. J., F. Cassidy, D. Naftolowitz, N. E. Tatham, W. H. Wilson, A. Iranmanesh, P. Y. Liu, and J. D. Veldhuis. 2007. “Pathophysiology of Hypercortisolism in Depression.” *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, no. 433: 90–103. doi:10.1111/j.1600-0447.2007.00967.x.
- Carroll, B. J., J. F. Greden, M. Feinberg, N. Lohr, N. M. James, M. Steiner, R. F. Haskett, A. A. Albala, J. P. DeVigne, and J. Tarika. 1981. “Neuroendocrine Evaluation of Depression in Borderline Patients.” *The Psychiatric Clinics of North America* 4 (1): 89–99.

- Caspi, Avshalom, Karen Sugden, Terrie E Moffitt, Alan Taylor, Ian W Craig, HonaLee Harrington, Joseph McClay, et al. 2003. "Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene." *Science (New York, N.Y.)* 301 (5631): 386–89. doi:10.1126/science.1083968.
- Castrén, Eero, and Tomi Rantamäki. 2010. "The Role of BDNF and Its Receptors in Depression and Antidepressant Drug Action: Reactivation of Developmental Plasticity." *Developmental Neurobiology* 70 (5): 289–97. doi:10.1002/dneu.20758.
- Catena-Dell'Osso, Mario, Andrea Fagiolini, Francesco Rotella, Stefano Baroni, and Donatella Marazziti. 2013. "Glutamate System as Target for Development of Novel Antidepressants." *CNS Spectrums* 18 (04): 188–98. doi:10.1017/S1092852912000971.
- Chaput, Y., C. de Montigny, and P. Blier. 1986. "Effects of a Selective 5-HT Reuptake Blocker, Citalopram, on the Sensitivity of 5-HT Autoreceptors: Electrophysiological Studies in the Rat Brain." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 333 (4): 342–48.
- Charney, D S, D B Menkes, and G R Heninger. 1981. "Receptor Sensitivity and the Mechanism of Action of Antidepressant Treatment. Implications for the Etiology and Therapy of Depression." *Archives of General Psychiatry* 38 (10): 1160–80.
- Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan, and N. Hirokawa. 1992. "Projection Domains of MAP2 and Tau Determine Spacings between Microtubules in Dendrites and Axons." *Nature* 360 (6405): 674–77. doi:10.1038/360674a0.
- Cominski, Tara P., Xilu Jiao, Jennifer E. Catuzzi, Amanda L. Stewart, and Kevin C. H. Pang. 2014. "The Role of the Hippocampus in Avoidance Learning and Anxiety Vulnerability." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 273. doi:10.3389/fnbeh.2014.00273.
- Coolen, Alex, Kerstin Hoffmann, R. Paulien Barf, Eberhard Fuchs, and Peter Meerlo. 2012. "Telemetric Study of Sleep Architecture and Sleep Homeostasis in the Day-Active Tree Shrew *Tupaia Belangeri*." *SLEEP*, June. doi:10.5665/sleep.1894.
- Cryan, John F., and Andrew Holmes. 2005. "The Ascent of Mouse: Advances in Modelling Human Depression and Anxiety." *Nature Reviews. Drug Discovery* 4 (9): 775–90. doi:10.1038/nrd1825.
- Czéh, Boldizsár, Thomas Michaelis, Takashi Watanabe, Jens Frahm, Gabriel de Biurrun, Marja van Kampen, Alessandro Bartolomucci, and Eberhard Fuchs. 2001. "Stress-Induced Changes in Cerebral Metabolites, Hippocampal Volume, and Cell Proliferation Are Prevented by Antidepressant Treatment with Tianeptine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22): 12796–801. doi:10.1073/pnas.211427898.
- Czéh, Boldizsár, Mária Simon, Barthel Schmelting, Christoph Hiemke, and Eberhard Fuchs. 2005. "Astroglial Plasticity in the Hippocampus Is Affected by Chronic Psychosocial Stress and Concomitant Fluoxetine Treatment." *Neuropsychopharmacology* 31 (8): 1616–26. doi:10.1038/sj.npp.1300982.

- Darnaudéry, M., M. Pallarés, J. J. Bouyer, M. Le Moal, and W. Mayo. 1999. "Infusion of Neurosteroids into the Rat Nucleus Basalis Affects Paradoxical Sleep in Accordance with Their Memory Modulating Properties." *Neuroscience* 92 (2): 583–88.
- Davenport, Andrew M., Leslie N. Collins, Hui Chiu, Paul J. Minor, Paul W. Sternberg, and André Hoelz. 2014. "Structural and Functional Characterization of the A-Tubulin Acetyltransferase MEC-17." *Journal of Molecular Biology* 426 (14): 2605–16. doi:10.1016/j.jmb.2014.05.009.
- De Bodinat, Christian, Béatrice Guardiola-Lemaitre, Elisabeth Mocaër, Pierre Renard, Carmen Muñoz, and Mark J. Millan. 2010. "Agomelatine, the First Melatonergic Antidepressant: Discovery, Characterization and Development." *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (8): 628–42. doi:10.1038/nrd3140.
- Dehmelt, Leif, and Shelley Halpain. 2005. "The MAP2/Tau Family of Microtubule-Associated Proteins." *Genome Biology* 6 (1): 204. doi:10.1186/gb-2004-6-1-204.
- De Montigny, C., and G. K. Aghajanian. 1978. "Tricyclic Antidepressants: Long-Term Treatment Increases Responsivity of Rat Forebrain Neurons to Serotonin." *Science (New York, N.Y.)* 202 (4374): 1303–6.
- Dent, Erik W., and Peter W. Baas. 2014. "Microtubules in Neurons as Information Carriers." *Journal of Neurochemistry* 129 (2): 235–39. doi:10.1111/jnc.12621.
- Deurwaerdère, Philippe De, Sylvia Navailles, Kelly A. Berg, William P. Clarke, and Umberto Spampinato. 2004. "Constitutive Activity of the Serotonin_{2C} Receptor Inhibits In Vivo Dopamine Release in the Rat Striatum and Nucleus Accumbens." *The Journal of Neuroscience* 24 (13): 3235–41. doi:10.1523/JNEUROSCI.0112-04.2004.
- DiazGranados, Nancy, Lobna A. Ibrahim, Nancy E. Brutsche, Rezvan Ameli, Ioline D. Henter, David A. Luckenbaugh, Rodrigo Machado-Vieira, and Carlos A. Zarate. 2010. "Rapid Resolution of Suicidal Ideation after a Single Infusion of an NMDA Antagonist in Patients with Treatment Resistant Major Depressive Disorder." *The Journal of Clinical Psychiatry* 71 (12): 1605–11. doi:10.4088/JCP.09m05327blu.
- Di Fabio, Romano, Giuseppe Alvaro, Simone Braggio, Renzo Carletti, Philip A. Gerrard, Cristiana Griffante, Carla Marchioro, et al. 2013. "Identification, Biological Characterization and Pharmacophoric Analysis of a New Potent and Selective NK1 Receptor Antagonist Clinical Candidate." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (21): 6264–73. doi:10.1016/j.bmc.2013.09.001.
- Di Simplicio, Martina, Sonia Doallo, Giulia Costoloni, Gustavo Rohenkohl, Anna C. Nobre, and Catherine J. Harmer. 2014. "'Can You Look Me in the Face?' Short-Term SSRI Administration Reverts Avoidant Ocular Face Exploration in Subjects at Risk for Psychopathology." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (13): 3059–66. doi:10.1038/npp.2014.159.
- Dremencov, Eliyahu, Mostafa El Mansari, and Pierre Blier. 2007. "Noradrenergic Augmentation of Escitalopram Response by Risperidone: Electrophysiologic Studies

- in the Rat Brain.” *Biological Psychiatry* 61 (5): 671–78. doi:10.1016/j.biopsych.2006.05.015.
- Dremencov, Eliyahu, Mostafa El Mansari, and Pierre Blier. 2009. “Effects of Sustained Serotonin Reuptake Inhibition on the Firing of Dopamine Neurons in the Rat Ventral Tegmental Area.” *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 34 (3): 223.
- Drevets, Wayne C., Joseph L. Price, and Maura L. Furey. 2008. “Brain Structural and Functional Abnormalities in Mood Disorders: Implications for Neurocircuitry Models of Depression.” *Brain Structure and Function* 213 (1-2): 93–118. doi:10.1007/s00429-008-0189-x.
- Drewes, Gerard, Bernhard Trinczek, Susanne Illenberger, Jacek Biernat, Gerold Schmitt-Ulms, Helmut E. Meyer, Eva-Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 1995. “Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase (p110mark) A Novel Protein Kinase That Regulates TAU-Microtubule Interactions and Dynamic Instability by Phosphorylation at The Alzheimer-Specific Site Serine 262.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7679–88. doi:10.1074/jbc.270.13.7679.
- Duman, R. S. 2002. “Pathophysiology of Depression: The Concept of Synaptic Plasticity.” *European Psychiatry, A new pharmacology of depression: the concept of synaptic plasticity*, 17, Supplement 3 (July): 306–10. doi:10.1016/S0924-9338(02)00654-5.
- Durand, M., O. Berton, S. Aguerre, L. Edno, I. Combourieu, P. Mormède, and F. Chaouloff. 1999. “Effects of Repeated Fluoxetine on Anxiety-Related Behaviours, Central Serotonergic Systems, and the Corticotropic Axis Axis in SHR and WKY Rats.” *Neuropharmacology* 38 (6): 893–907.
- Duric, Vanja, Mounira Banasr, Craig A. Stockmeier, Arthur A. Simen, Samuel S. Newton, James C. Overholser, George J. Jurjus, Lesa Dieter, and Ronald S. Duman. 2013. “Altered Expression of Synapse and Glutamate Related Genes in Post-Mortem Hippocampus of Depressed Subjects.” *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16 (01): 69–82. doi:10.1017/S1461145712000016.
- Eddé, B., J. Rossier, J. P. Le Caer, E. Desbruyères, F. Gros, and P. Denoulet. 1990. “Posttranslational Glutamylation of Alpha-Tubulin.” *Science (New York, N.Y.)* 247 (4938): 83–85.
- Eipper, Betty A. 1972. “Rat Brain Microtubule Protein: Purification and Determination of Covalently Bound Phosphate and Carbohydrate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (8): 2283.
- El-Hage, Wissam, Samuel Leman, Vincent Camus, and Catherine Belzung. 2013. “Mechanisms of Antidepressant Resistance.” *Frontiers in Pharmacology* 4: 146. doi:10.3389/fphar.2013.00146.
- Elliott, Evan, Gili Ezra-Nevo, Limor Regev, Adi Neufeld-Cohen, and Alon Chen. 2010. “Resilience to Social Stress Coincides with Functional DNA Methylation of the Crf Gene in Adult Mice.” *Nature Neuroscience* 13 (11): 1351–53. doi:10.1038/nn.2642.

- Essex, Marilyn J., W. Thomas Boyce, Clyde Hertzman, Lucia L. Lam, Jeffrey M. Armstrong, Sarah M. A. Neumann, and Michael S. Kobor. 2013. "Epigenetic Vestiges of Early Developmental Adversity: Childhood Stress Exposure and DNA Methylation in Adolescence." *Child Development* 84 (1): 58–75. doi:10.1111/j.1467-8624.2011.01641.x.
- Fava, M, and K G Davidson. 1996. "Definition and Epidemiology of Treatment-Resistant Depression." *The Psychiatric Clinics of North America* 19 (2): 179–200.
- Felgner, H, R Frank, J Biernat, E M Mandelkow, E Mandelkow, B Ludin, A Matus, and M Schliwa. 1997. "Domains of Neuronal Microtubule-Associated Proteins and Flexural Rigidity of Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 138 (5): 1067–75.
- Fischer, H D, T Heinzeller, and A Raab. 1985. "Gonadal Response to Psychosocial Stress in Male Tree Shrews (*Tupaia Belangeri*) Morphometry of Testis, Epididymis and Prostate." *Andrologia* 17 (3): 262–75.
- Flockhart, David A. 2012. "Dietary Restrictions and Drug Interactions with Monoamine Oxidase Inhibitors: An Update." *The Journal of Clinical Psychiatry* 73 Suppl 1: 17–24. doi:10.4088/JCP.11096su1c.03.
- Fontaine-Lenoir, Virginie, and Étienne-Emile Baulieu. 2006. "Effets neurotrophiques et neuroprotecteurs de stéroïdes: un mécanisme impliquant les microtubules." Thèse de sciences - Université Paris-Sud
- Fontaine-Lenoir, Virginie, Béatrice Chambraud, Arlette Fellous, Sébastien David, Yann Duchossoy, Etienne-Emile Baulieu, and Paul Robel. 2006. "Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) Is a Neurosteroid Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4711–16. doi:10.1073/pnas.0600113103.
- Fournet, Vincent, Gaetan de Lavilléon, Annie Schweitzer, Bruno Giros, Annie Andrieux, and Marie-Pascale Martres. 2012. "Both Chronic Treatments by Epothilone D and Fluoxetine Increase the Short-Term Memory and Differentially Alter the Mood Status of STOP/MAP6 KO Mice." *Journal of Neurochemistry* 123 (6): 982–96. doi:10.1111/jnc.12027.
- Fournet, Vincent, Annie Schweitzer, Caroline Chevarin, Jean-Christophe Deloulme, Michel Hamon, Bruno Giros, Annie Andrieux, and Marie-Pascale Martres. 2012. "The Deletion of STOP/MAP6 Protein in Mice Triggers Highly Altered Mood and Impaired Cognitive Performances." *Journal of Neurochemistry* 121 (1): 99–114. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07615.x.
- Frodl, Thomas, and Veronica O’Keane. 2013. "How Does the Brain Deal with Cumulative Stress? A Review with Focus on Developmental Stress, HPA Axis Function and Hippocampal Structure in Humans." *Neurobiology of Disease* 52 (April): 24–37. doi:10.1016/j.nbd.2012.03.012.
- Froger, Nicolas, Enza Palazzo, Claudette Boni, Naïma Hanoun, Françoise Saurini, Chantal Joubert, Isabelle Dutriez-Casteloot, et al. 2004. "Neurochemical and Behavioral

- Alterations in Glucocorticoid Receptor-Impaired Transgenic Mice after Chronic Mild Stress.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (11): 2787–96. doi:10.1523/JNEUROSCI.4132-03.2004.
- Frye, Cheryl A, Alicia A Walf, Madeline E Rhodes, and Jacob P Harney. 2004. “Progesterone Enhances Motor, Anxiolytic, Analgesic, and Antidepressive Behavior of Wild-Type Mice, but Not Those Deficient in Type 1 5 α -Reductase.” *Brain Research* 1004 (1–2): 116–24. doi:10.1016/j.brainres.2004.01.020.
- Fuchs, Eberhard. 2005. “Social Stress in Tree Shrews as an Animal Model of Depression: An Example of a Behavioral Model of a CNS Disorder.” *CNS Spectrums* 10 (3): 182–90.
- Fuchs, Eberhard, and Silke Corbach-Söhle. 2010. “Tree Shrews.” In *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, edited by Robert Hubrecht and James Kirkwood, 262–75. Wiley-Blackwell. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444318777.ch20/summary>.
- Fuchs, Eberhard, and Gabriele Flügge. 2002. “Social Stress in Tree Shrews: Effects on Physiology, Brain Function, and Behavior of Subordinate Individuals.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73 (1): 247–58. doi:10.1016/S0091-3057(02)00795-5.
- Fuchs, Eberhard, Gabriele Flügge, Frauke Ohl, Paul Lucassen, Gesa K Vollmann-Honsdorf, and Thomas Michaelis. 2001. “Psychosocial Stress, Glucocorticoids, and Structural Alterations in the Tree Shrew Hippocampus.” *Physiology & Behavior, Social Stress: Acute and Long-term Effects on Physiology & Behavior*, 73 (3): 285–91. doi:10.1016/S0031-9384(01)00497-8.
- Fuchs, Eberhard, Marian Kramer, Birgit Hermes, Petra Netter, and Christoph Hiemke. 1996. “Psychosocial Stress in Tree Shrews: Clomipramine Counteracts Behavioral and Endocrine Changes.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior, Anxiety, Stress and Depression*, 54 (1): 219–28. doi:10.1016/0091-3057(95)02166-3.
- Fuchs, E, B Czéh, T Michaelis, G de Biurrun, T Watanabe, and J Frahm. 2002. “Synaptic Plasticity and Tianeptine: Structural Regulation.” *European Psychiatry, A new pharmacology of depression: the concept of synaptic plasticity*, 17, Supplement 3 (July): 311–17. doi:10.1016/S0924-9338(02)00652-1.
- Fuchs, E, O Jöhren, and G Flügge. 1993. “Psychosocial Conflict in the Tree Shrew: Effects on Sympathoadrenal Activity and Blood Pressure.” *Psychoneuroendocrinology* 18 (8): 557–65.
- George, Olivier, Monique Vallée, Michel Le Moal, and Willy Mayo. 2006. “Neurosteroids and Cholinergic Systems: Implications for Sleep and Cognitive Processes and Potential Role of Age-Related Changes.” *Psychopharmacology* 186 (3): 402–13. doi:10.1007/s00213-005-0254-6.
- Glowinski, J., and J. Axelrod. 1964. “Inhibition Of Uptake Of Tritiated-Noradrenaline In The Intact Rat Brain By Imipramine And Structurally Related Compounds.” *Nature* 204 (December): 1318–19.

- Goosens, Ki A., and Robert M. Sapolsky. 2007. "Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging." In *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, edited by David R. Riddle. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3870/>.
- Gould, E., H. A. Cameron, D. C. Daniels, C. S. Woolley, and B. S. McEwen. 1992. "Adrenal Hormones Suppress Cell Division in the Adult Rat Dentate Gyrus." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 12 (9): 3642–50.
- Gould, Elizabeth, Patima Tanapat, Tracy Rydel, and Nicholas Hastings. 2000. "Regulation of Hippocampal Neurogenesis in Adulthood." *Biological Psychiatry* 48 (8): 715–20. doi:10.1016/S0006-3223(00)01021-0.
- Gould, E, B S McEwen, P Tanapat, L A Galea, and E Fuchs. 1997. "Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Tree Shrew Is Regulated by Psychosocial Stress and NMDA Receptor Activation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (7): 2492–98.
- Griebel, Guy, Caroline Cohen, Ghislaine Perrault, and David J Sanger. 1999. "Behavioral Effects of Acute and Chronic Fluoxetine in Wistar–Kyoto Rats." *Physiology & Behavior* 67 (3): 315–20. doi:10.1016/S0031-9384(98)00298-4.
- Halpain, Shelley, and Leif Dehmelt. 2006. "The MAP1 Family of Microtubule-Associated Proteins." *Genome Biology* 7 (6): 224. doi:10.1186/gb-2006-7-6-224.
- Hamilton, Max. 1960. "A Rating Scale for Depression." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 23 (1): 56–62. doi:10.1136/jnnp.23.1.56.
- Hamilton, Max. 1967. "Development of a Rating Scale for Primary Depressive Illness." *British Journal of Social and Clinical Psychology* 6 (4): 278–96. doi:10.1111/j.2044-8260.1967.tb00530.x.
- Hamon, M., and S. Bourgoin. 2006. "Pharmacological Profile of Antidepressants: A Likely Basis for Their Efficacy and Side Effects?" *European Neuropsychopharmacology* 16, Supplement 5 (September): S625–32. doi:10.1016/S0924-977X(06)70008-6.
- Hamon, Michel, and Pierre Blier. 2013. "Monoamine Neurocircuitry in Depression and Strategies for New Treatments." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 45 (August): 54–63. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.009.
- Hasler, van der Veen, Tumonis, Meyers, Shen, and Drevets. 2007. "REduced Prefrontal Glutamate/glutamine and Γ -Aminobutyric Acid Levels in Major Depression Determined Using Proton Magnetic Resonance Spectroscopy." *Archives of General Psychiatry* 64 (2): 193–200. doi:10.1001/archpsyc.64.2.193.
- Hedlund, Peter B. 2009. "The 5-HT₇ Receptor and Disorders of the Nervous System: An Overview." *Psychopharmacology* 206 (3): 345–54. doi:10.1007/s00213-009-1626-0.
- Henry, J A. 1992. "Toxicity of Antidepressants: Comparisons with Fluoxetine." *International Clinical Psychopharmacology* 6 Suppl 6 (June): 22–27.

- Hernández, M A, F Wandosell, and J Avila. 1987. "Localization of the Phosphorylation Sites for Different Kinases in the Microtubule-Associated Protein MAP2." *Journal of Neurochemistry* 48 (1): 84–93.
- Hirokawa, N., T. Funakoshi, R. Sato-Harada, and Y. Kanai. 1996. "Selective Stabilization of Tau in Axons and Microtubule-Associated Protein 2C in Cell Bodies and Dendrites Contributes to Polarized Localization of Cytoskeletal Proteins in Mature Neurons." *The Journal of Cell Biology* 132 (4): 667–79. doi:10.1083/jcb.132.4.667.
- Holmans, Peter, Myrna M Weissman, George S Zubenko, William A Scheftner, Raymond R Crowe, J Raymond Depaulo Jr, James A Knowles, et al. 2007. "Genetics of Recurrent Early-Onset Major Depression (GenRED): Final Genome Scan Report." *The American Journal of Psychiatry* 164 (2): 248–58. doi:10.1176/appi.ajp.164.2.248.
- Holmes, T. H., and R. H. Rahe. 1967. "The Social Readjustment Rating Scale." *Journal of Psychosomatic Research* 11 (2): 213–18.
- Holsboer, F, H G Doerr, and W G Sippell. 1982. "Dexamethasone Suppression of 11-Deoxycorticosterone, Corticosterone and Cortisol in Depressed Female Patients and Normal Controls." *Acta Psychiatrica Scandinavica* 66 (1): 18–25.
- Holsboer, Florian. 2001. "Stress, Hypercortisolism and Corticosteroid Receptors in Depression: Implications for Therapy." *Journal of Affective Disorders* 62 (1–2): 77–91. doi:10.1016/S0165-0327(00)00352-9.
- Hoogenraad, Casper C., and Frank Bradke. 2009. "Control of Neuronal Polarity and Plasticity – a Renaissance for Microtubules?" *Trends in Cell Biology* 19 (12): 669–76. doi:10.1016/j.tcb.2009.08.006.
- Horstmann, Sonja, and Elisabeth B Binder. 2011. "Glucocorticoids as Predictors of Treatment Response in Depression." *Harvard Review of Psychiatry* 19 (3): 125–43. doi:10.3109/10673229.2011.586550.
- Hoshi, Minako, Tetsu Akiyama, Yukiko Shinohara, Yoshihiko Miyata, Hiroshi Ogawara, Eisuke Nishida, and Hikoichi Sakai. 1988. "Protein-Kinase-C-Catalyzed Phosphorylation of the Microtubule-Binding Domain of Microtubule-Associated Protein 2 Inhibits Its Ability to Induce Tubulin Polymerization." *European Journal of Biochemistry* 174 (2): 225–30. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14086.x.
- Hsu, Eugenia, Corrie A Davies, and David J Hansen. 2004. "Understanding Mental Health Needs of Southeast Asian Refugees: Historical, Cultural, and Contextual Challenges." *Clinical Psychology Review* 24 (2): 193–213. doi:10.1016/j.cpr.2003.10.003.
- Hubbert, Charlotte, Amaris Guardiola, Rong Shao, Yoshiharu Kawaguchi, Akihiro Ito, Andrew Nixon, Minoru Yoshida, Xiao-Fan Wang, and Tso-Pang Yao. 2002. "HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase." *Nature* 417 (6887): 455–58. doi:10.1038/417455a.
- Illenberger, Susanne, Gerard Drewes, Bernhard Trinczek, Jacek Biernat, Helmut E. Meyer, Joanna B. Olmsted, Eva-Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 1996. "Phosphorylation of Microtubule-Associated Proteins MAP2 and MAP4 by the

- Protein Kinase p110 Phosphorylation Sites and Regulation of Microtubule Dynamics.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (18): 10834–43. doi:10.1074/jbc.271.18.10834.
- Insel, T. R., and E. M. Scolnick. 2006. “Cure Therapeutics and Strategic Prevention: Raising the Bar for Mental Health Research.” *Molecular Psychiatry* 11 (1): 11–17. doi:10.1038/sj.mp.4001777.
- Inta, Dragos, Dragana Filipovic, Juan M. Lima-Ojeda, Christof Dormann, Natascha Pfeiffer, Fabrizio Gasparini, and Peter Gass. 2012. “The mGlu5 Receptor Antagonist MPEP Activates Specific Stress-Related Brain Regions and Lacks Neurotoxic Effects of the NMDA Receptor Antagonist MK-801: Significance for the Use as Anxiolytic/antidepressant Drug.” *Neuropharmacology* 62 (5–6): 2034–39. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.12.035.
- Itoh, Tomohiko J., and Hirokazu Hotani. 2004. “Microtubule Dynamics and the Regulation by Microtubule-Associated Proteins (MAPs).” *Uchū Seibutsu Kagaku* 18 (3): 116–17.
- Jackson, Melinda L., Glenn Gunzelmann, Paul Whitney, John M. Hinson, Gregory Belenky, Arnaud Rabat, and Hans P.A. Van Dongen. 2013. “Deconstructing and Reconstructing Cognitive Performance in Sleep Deprivation.” *Sleep Medicine Reviews* 17 (3): 215–25. doi:10.1016/j.smr.2012.06.007.
- Jacobsen, J. P. R., W. B. Siesser, B. D. Sachs, S. Peterson, M. J. Cools, V. Setola, J. H. A. Folgering, G. Flik, and M. G. Caron. 2012. “Deficient Serotonin Neurotransmission and Depression-like Serotonin Biomarker Alterations in Tryptophan Hydroxylase 2 (Tph2) Loss-of-Function Mice.” *Molecular Psychiatry* 17 (7): 694–704. doi:10.1038/mp.2011.50.
- Jöhren, O, G Flügge, and E Fuchs. 1994. “Hippocampal Glucocorticoid Receptor Expression in the Tree Shrew: Regulation by Psychosocial Conflict.” *Cellular and Molecular Neurobiology* 14 (3): 281–96.
- Jun, Heechul, Syed Mohammed Qasim Hussaini, Michael J Rigby, and Mi-Hyeon Jang. 2012. “Functional Role of Adult Hippocampal Neurogenesis as a Therapeutic Strategy for Mental Disorders.” *Neural Plasticity* 2012: 854285. doi:10.1155/2012/854285.
- Kalcheva, N., J. Albala, K. O’Guin, H. Rubino, C. Garner, and B. Shafit-Zagardo. 1995. “Genomic Structure of Human Microtubule-Associated Protein 2 (MAP-2) and Characterization of Additional MAP-2 Isoforms.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (24): 10894–98.
- Kampen, Marja van, Marian Kramer, Christoph Hiemke, Gabriele Flügge, and Eberhard Fuchs. 2002. “The Chronic Psychosocial Stress Paradigm in Male Tree Shrews: Evaluation of a Novel Animal Model for Depressive Disorders.” *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 5 (1): 37–46. doi:10.1080/102538902900012396.
- Karege, Félicien, Guido Bondolfi, Nicola Gervasoni, Michèle Schwald, Jean-Michel Aubry, and Gilles Bertschy. 2005. “Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Serum of Depressed Patients Probably Results from Lowered Platelet BDNF

- Release Unrelated to Platelet Reactivity.” *Biological Psychiatry* 57 (9): 1068–72. doi:10.1016/j.biopsych.2005.01.008.
- Katalinic, Natalie, Rosalyn Lai, Andrew Somogyi, Philip B Mitchell, Paul Glue, and Colleen K Loo. 2013. “Ketamine as a New Treatment for Depression: A Review of Its Efficacy and Adverse Effects.” *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 47 (8): 710–27. doi:10.1177/0004867413486842.
- Katz, Martin M, Janet L Tekell, Charles L Bowden, Steve Brannan, John P Houston, Nancy Berman, and Alan Frazer. 2004. “Onset and Early Behavioral Effects of Pharmacologically Different Antidepressants and Placebo in Depression.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29 (3): 566–79. doi:10.1038/sj.npp.1300341.
- Kawamichi, Takeo, and Mieko Kawamichi. 1979. “Spatial Organization and Territory of Three Shrews (*Tupaia Glis*).” *Animal Behaviour* 27, Part 2 (May): 381–93. doi:10.1016/0003-3472(79)90173-8.
- Keefe, R. S. 1995. “The Contribution of Neuropsychology to Psychiatry.” *The American Journal of Psychiatry* 152 (1): 6–15.
- Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, and et al. 2010. “INcreased Bdnf Promoter Methylation in the Wernicke Area of Suicide Subjects.” *Archives of General Psychiatry* 67 (3): 258–67. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.9.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, and F. H. Gage. 1997. “More Hippocampal Neurons in Adult Mice Living in an Enriched Environment.” *Nature* 386 (6624): 493–95. doi:10.1038/386493a0.
- Kendler, K S, L M Karkowski, and C A Prescott. 1999. “Causal Relationship between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression.” *The American Journal of Psychiatry* 156 (6): 837–41.
- Kendler, K. S., and C. A. Prescott. 1999. “A Population-Based Twin Study of Lifetime Major Depression in Men and Women.” *Archives of General Psychiatry* 56 (1): 39–44.
- Kennedy, Sidney H., Kenneth R. Evans, Stephanie Krüger, Helen S. Mayberg, Jeffrey H. Meyer, Sonia McCann, Andrew I. Arifuzzman, Sylvain Houle, and Franco J. Vaccarino. 2001. “Changes in Regional Brain Glucose Metabolism Measured With Positron Emission Tomography After Paroxetine Treatment of Major Depression.” *American Journal of Psychiatry* 158 (6): 899–905. doi:10.1176/appi.ajp.158.6.899.
- Khawaja, S., G. G. Gundersen, and J. C. Bulinski. 1988. “Enhanced Stability of Microtubules Enriched in Detyrosinated Tubulin Is Not a Direct Function of Detyrosination Level.” *The Journal of Cell Biology* 106 (1): 141–49. doi:10.1083/jcb.106.1.141.
- Khisti, Rahul T., and Chandrabhan T. Chopde. 2000. “Serotonergic Agents Modulate Antidepressant-like Effect of the Neurosteroid 3 α -Hydroxy-5 α -Pregnan-20-One in Mice.” *Brain Research* 865 (2): 291–300. doi:10.1016/S0006-8993(00)02373-8.

- Kitaichi, Yuji, Takeshi Inoue, Shin Nakagawa, Shuken Boku, Aya Kakuta, Takeshi Izumi, and Tsukasa Koyama. 2010. "Sertraline Increases Extracellular Levels Not Only of Serotonin, but Also of Dopamine in the Nucleus Accumbens and Striatum of Rats." *European Journal of Pharmacology* 647 (1–3): 90–96. doi:10.1016/j.ejphar.2010.08.026.
- Klengel, Torsten, Julius Pape, Elisabeth B. Binder, and Divya Mehta. 2014. "The Role of DNA Methylation in Stress-Related Psychiatric Disorders." *Neuropharmacology, Neuroepigenetic Disorders*, 80 (May): 115–32. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.013.
- Kobayashi, T. 1975. "Dephosphorylation of Tubulin-Bound Guanosine Triphosphate during Microtubule Assembly." *Journal of Biochemistry* 77 (6): 1193–97.
- Kohlhause, Susan, Kerstin Hoffmann, Christina Schlumbohm, Eberhard Fuchs, and Gabriele Flügge. 2011. "Nocturnal Hyperthermia Induced by Social Stress in Male Tree Shrews: Relation to Low Testosterone and Effects of Age." *Physiology & Behavior* 104 (5): 786–95. doi:10.1016/j.physbeh.2011.07.023.
- Kozicz, T., L. A. P. Bordewin, B. Czéh, E. Fuchs, and E. W. Roubos. 2008. "Chronic Psychosocial Stress Affects Corticotropin-Releasing Factor in the Paraventricular Nucleus and Central Extended Amygdala as Well as Urocortin 1 in the Non-Preganglionic Edinger-Westphal Nucleus of the Tree Shrew." *Psychoneuroendocrinology* 33 (6): 741–54. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.02.012.
- Kramer, Mark S., Neal Cutler, John Feighner, Ram Shrivastava, John Carman, John J. Sramek, Scott A. Reines, et al. 1998. "Distinct Mechanism for Antidepressant Activity by Blockade of Central Substance P Receptors." *Science* 281 (5383): 1640–45. doi:10.1126/science.281.5383.1640.
- Kramer, M, C Hiemke, and E Fuchs. 1999. "Chronic Psychosocial Stress and Antidepressant Treatment in Tree Shrews: Time-Dependent Behavioral and Endocrine Effects." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23 (7): 937–47. doi:10.1016/S0149-7634(99)00027-5.
- Kriegs, Jan Ole, Gennady Churakov, Jerzy Jurka, Jürgen Brosius, and Jürgen Schmitz. 2007. "Evolutionary History of 7SL RNA-Derived SINEs in Supraprimates." *Trends in Genetics* 23 (4): 158–61. doi:10.1016/j.tig.2007.02.002.
- Krishnan, Vaishnav, and Eric J. Nestler. 2008. "The Molecular Neurobiology of Depression." *Nature* 455 (7215): 894–902. doi:10.1038/nature07455.
- Krystal, Karper, Seibyl, and et al. 1994. "Subanesthetic Effects of the Noncompetitive Nmda Antagonist, Ketamine, in Humans: Psychotomimetic, Perceptual, Cognitive, and Neuroendocrine Responses." *Archives of General Psychiatry* 51 (3): 199–214. doi:10.1001/archpsyc.1994.03950030035004.
- Kuhn, R. 1958. "The Treatment of Depressive States with G 22355 (imipramine Hydrochloride)." *The American Journal of Psychiatry* 115 (5): 459–64.

- Kupfer, David J. 1995. "Sleep Research in Depressive Illness: Clinical Implications —a Tasting Menu." *Biological Psychiatry* 38 (6): 391–403. doi:10.1016/0006-3223(94)00295-E.
- Kupfer DJ, and Ehlers CL. 1989. "Two Roads to Rapid Eye Movement Latency." *Archives of General Psychiatry* 46 (10): 945–48. doi:10.1001/archpsyc.1989.01810100087016.
- Kupfer, D J, and F G Foster. 1972. "Interval between Onset of Sleep and Rapid-Eye-Movement Sleep as an Indicator of Depression." *Lancet* 2 (7779): 684–86.
- Kurre, J., and E. Fuchs. 1988. "[Measuring the spontaneous activity of tree shrews (*Tupaia belangeri*) with passive infrared detectors]." *Zeitschrift Für Versuchstierkunde* 31 (3): 105–10.
- Lacerda, Acioly L. T, Matcheri S Keshavan, Antonio Y Hardan, Ozgur Yorbik, Paolo Brambilla, Roberto B Sassi, Mark Nicoletti, et al. 2004. "Anatomic Evaluation of the Orbitofrontal Cortex in Major Depressive Disorder." *Biological Psychiatry* 55 (4): 353–58. doi:10.1016/j.biopsych.2003.08.021.
- Ladurelle, Nataly, Cecilia Gabriel, Adela Viggiano, Elisabeth Mocaër, Etienne E. Baulieu, and Massimiliano Bianchi. 2012. "Agomelatine (S20098) Modulates the Expression of Cytoskeletal Microtubular Proteins, Synaptic Markers and BDNF in the Rat Hippocampus, Amygdala and PFC." *Psychopharmacology* 221 (3): 493–509. doi:10.1007/s00213-011-2597-5.
- Lahmame, A., and A. Armario. 1996. "Differential Responsiveness of Inbred Strains of Rats to Antidepressants in the Forced Swimming Test: Are Wistar Kyoto Rats an Animal Model of Subsensitivity to Antidepressants?" *Psychopharmacology* 123 (2): 191–98.
- Lanfume, Laurence, Raymond Mongeau, Charles Cohen-Salmon, and Michel Hamon. 2008. "Corticosteroid-serotonin Interactions in the Neurobiological Mechanisms of Stress-Related Disorders." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, The long-term consequences of stress on brain function: from adaptation to mental diseases, 32 (6): 1174–84. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.04.006.
- Leggio, Gian Marco, Salvatore Salomone, Claudio Bucolo, Chiara Platania, Vincenzo Micale, Filippo Caraci, and Filippo Drago. 2013. "Dopamine D(3) Receptor as a New Pharmacological Target for the Treatment of Depression." *European Journal of Pharmacology* 719 (1-3): 25–33. doi:10.1016/j.ejphar.2013.07.022.
- Lewis, S A, and N Cowan. 1990. "Microtubule Bundling." *Nature* 345 (6277): 674. doi:10.1038/345674a0.
- Lewis, S A, D H Wang, and N J Cowan. 1988. "Microtubule-Associated Protein MAP2 Shares a Microtubule Binding Motif with Tau Protein." *Science (New York, N.Y.)* 242 (4880): 936–39.
- L'Hernault, S. W., and J. L. Rosenbaum. 1983. "Chlamydomonas Alpha-Tubulin Is Posttranslationally Modified in the Flagella during Flagellar Assembly." *The Journal of Cell Biology* 97 (1): 258–63. doi:10.1083/jcb.97.1.258.

- Li, N., B. Lee, R.-J. Liu, M. Banasr, J. M. Dwyer, M. Iwata, X.-Y. Li, G. Aghajanian, and R. S. Duman. 2010. "mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists." *Science* 329 (5994): 959–64. doi:10.1126/science.1190287.
- Li, Xia, Anne B. Need, Melvyn Baez, and Jeffrey M. Witkin. 2006. "Metabotropic Glutamate 5 Receptor Antagonism Is Associated with Antidepressant-Like Effects in Mice." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319 (1): 254–59. doi:10.1124/jpet.106.103143.
- Li, Y., and M. M. Black. 1996. "Microtubule Assembly and Turnover in Growing Axons." *The Journal of Neuroscience* 16 (2): 531–44.
- Loomer, H. P., J. C. Saunders, and N. S. Kline. 1957. "A Clinical and Pharmacodynamic Evaluation of Iproniazid as a Psychic Energizer." *Psychiatric Research Reports* 8 (December): 129–41.
- López-Rubalcava, Carolina, and Irwin Lucki. 2000. "Strain Differences in the Behavioral Effects of Antidepressant Drugs in the Rat Forced Swimming Test." *Neuropsychopharmacology* 22 (2): 191–99. doi:10.1016/S0893-133X(99)00100-1.
- Lorenzetti, Valentina, Nicholas B. Allen, Alex Fornito, and Murat Yücel. 2009. "Structural Brain Abnormalities in Major Depressive Disorder: A Selective Review of Recent MRI Studies." *Journal of Affective Disorders* 117 (1–2): 1–17. doi:10.1016/j.jad.2008.11.021.
- Lotrich, Francis E., and Bruce G. Pollock. 2004. "Meta-Analysis of Serotonin Transporter Polymorphisms and Affective Disorders." *Psychiatric Genetics* 14 (3): 121–29.
- Lucas, Guillaume, Vladimir V. Rymar, Jenny Du, Ouissame Mnie-Filali, Christina Bisgaard, Stella Manta, Laura Lambas-Senas, et al. 2007. "Serotonin(4) (5-HT(4)) Receptor Agonists Are Putative Antidepressants with a Rapid Onset of Action." *Neuron* 55 (5): 712–25. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.041.
- Lucassen, Paul J., Gesa K. Vollmann-Honsdorf, Mira Gleisberg, Boldizsár Czéh, E. Ron De Kloet, and Eberhard Fuchs. 2001. "Chronic Psychosocial Stress Differentially Affects Apoptosis in Hippocampal Subregions and Cortex of the Adult Tree Shrew." *European Journal of Neuroscience* 14 (1): 161–66. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01629.x.
- Maas, J W, S H Koslow, J Davis, M Katz, A Frazer, C L Bowden, N Berman, R Gibbons, P Stokes, and D H Landis. 1987. "Catecholamine Metabolism and Disposition in Healthy and Depressed Subjects." *Archives of General Psychiatry* 44 (4): 337–44.
- MacQueen, Glenda M., Stephanie Campbell, Bruce S. McEwen, Kathryn Macdonald, Shigeko Amano, Russell T. Joffe, Claude Nahmias, and L. Trevor Young. 2003. "Course of Illness, Hippocampal Function, and Hippocampal Volume in Major Depression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (3): 1387–92. doi:10.1073/pnas.0337481100.

- MacRae, Thomas H. 1997. "Tubulin Post-Translational Modifications." *European Journal of Biochemistry* 244 (2): 265–78. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00265.x.
- Magariños, Ana María, Bruce S. McEwen, Gabriele Flügge, and Eberhard Fuchs. 1996. "Chronic Psychosocial Stress Causes Apical Dendritic Atrophy of Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons in Subordinate Tree Shrews." *The Journal of Neuroscience* 16 (10): 3534–40.
- Malenka, Robert C., and Roger A. Nicoll. 1999. "Long-Term Potentiation--A Decade of Progress?" *Science* 285 (5435): 1870–74. doi:10.1126/science.285.5435.1870.
- Mandelkow, E., and E. M. Mandelkow. 1995. "Microtubules and Microtubule-Associated Proteins." *Current Opinion in Cell Biology* 7 (1): 72–81.
- Manji, Husseini K, Jorge A Quiroz, Jonathan Sporn, Jennifer L Payne, Kirk Denicoff, Neil A. Gray, Carlos A Zarate Jr., and Dennis S Charney. 2003. "Enhancing Neuronal Plasticity and Cellular Resilience to Develop Novel, Improved Therapeutics for Difficult-to-Treat Depression." *Biological Psychiatry* 53 (8): 707–42. doi:10.1016/S0006-3223(03)00117-3.
- Marazziti, Donatella, Angela Di Muro, and Paolo Castrogiovanni. 1992. "Psychological Stress and Body Temperature Changes in Humans." *Physiology & Behavior* 52 (2): 393–95. doi:10.1016/0031-9384(92)90290-I.
- Marks, David M, Min-Hyeon Park, Byung-Joo Ham, Changsu Han, Ashwin A Patkar, Prakash S Masand, and Chi-Un Pae. 2008. "Paroxetine: Safety and Tolerability Issues." *Expert Opinion on Drug Safety* 7 (6): 783–94. doi:10.1517/14740330802423168.
- Marx, C. E., D. W. Bradford, R. M. Hamer, J. C. Naylor, T. B. Allen, J. A. Lieberman, J. L. Strauss, and J. D. Kilts. 2011. "Pregnenolone as a Novel Therapeutic Candidate in Schizophrenia: Emerging Preclinical and Clinical Evidence." *Neuroscience* 191 (September): 78–90. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.076.
- Marx, Christine E., Richard S. E. Keefe, Robert W. Buchanan, Robert M. Hamer, Jason D. Kilts, Daniel W. Bradford, Jennifer L. Strauss, et al. 2009. "Proof-of-Concept Trial with the Neurosteroid Pregnenolone Targeting Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34 (8): 1885–1903. doi:10.1038/npp.2009.26.
- Massart, Renaud, Raymond Mongeau, and Laurence Lanfumey. 2012. "Beyond the Monoaminergic Hypothesis: Neuroplasticity and Epigenetic Changes in a Transgenic Mouse Model of Depression." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1601): 2485–94. doi:10.1098/rstb.2012.0212.
- Mathews, Daniel C., Ioline D. Henter, and Carlos A. Zarate. 2012. "Targeting the Glutamatergic System to Treat Major Depressive Disorder: Rationale and Progress to Date." *Drugs* 72 (10): 1313–33. doi:10.2165/11633130-000000000-00000.
- Matsuyama, Akihisa, Tadahiro Shimazu, Yuko Sumida, Akiko Saito, Yasuhiro Yoshimatsu, Daphne Seigneurin-Berny, Hiroyuki Osada, et al. 2002. "In Vivo Destabilization of

- Dynamic Microtubules by HDAC6-Mediated Deacetylation.” *The EMBO Journal* 21 (24): 6820–31. doi:10.1093/emboj/cdf682.
- McEwen, B. S., D. Albeck, H. Cameron, H. M. Chao, E. Gould, N. Hastings, Y. Kuroda, V. Luine, A. M. Magariños, and C. R. McKittrick. 1995. “Stress and the Brain: A Paradoxical Role for Adrenal Steroids.” *Vitamins and Hormones* 51: 371–402.
- McKinnon, Margaret C., Kaan Yucel, Anthony Nazarov, and Glenda M. MacQueen. 2009. “A Meta-Analysis Examining Clinical Predictors of Hippocampal Volume in Patients with Major Depressive Disorder.” *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN* 34 (1): 41.
- McKittrick, C. R., A. M. Magariños, D. C. Blanchard, R. J. Blanchard, B. S. McEwen, and R. Sakai. 2000. “Chronic Social Stress Reduces Dendritic Arbors in CA3 of Hippocampus and Decreases Binding to Serotonin Transporter Sites.” *Synapse (New York, N.Y.)* 36 (2): 85–94. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(200005)36:2<85::AID-SYN1>3.0.CO;2-Y.
- Meyer, Ute, Marja van Kampen, Eleonora Isovich, Gabriele Flügge, and Eberhard Fuchs. 2001. “Chronic Psychosocial Stress Regulates the Expression of Both GR and MR mRNA in the Hippocampal Formation of Tree Shrews.” *Hippocampus* 11 (3): 329–36. doi:10.1002/hipo.1047.
- Michael-Titus, Adina T., Monika Albert, Gregory J. Michael, Thomas Michaelis, Takashi Watanabe, Jens Frahm, Olga Pudovkina, et al. 2008. “SONU20176289, a Compound Combining Partial Dopamine D2 Receptor Agonism with Specific Serotonin Reuptake Inhibitor Activity, Affects Neuroplasticity in an Animal Model for Depression.” *European Journal of Pharmacology* 598 (1–3): 43–50. doi:10.1016/j.ejphar.2008.09.006.
- Mizota, Kaori, and Hiroshi Ueda. 2008. “N-Terminus of MAP2C as a Neurosteroid-Binding Site. [Miscellaneous Article].” *Neuroreport October 8, 2008* 19 (15): 1529–33. doi:10.1097/WNR.0b013e328310fe97.
- Mnie-Filali, Ouissame, Céline Faure, Laura Lambás-Señas, Mostafa El Mansari, Hassina Belblidia, Elise Gondard, Adeline Etiévant, et al. 2011. “Pharmacological Blockade of 5-HT₇ Receptors as a Putative Fast Acting Antidepressant Strategy.” *Neuropsychopharmacology* 36 (6): 1275–88. doi:10.1038/npp.2011.13.
- Mnie-Filali, Ouissame, Laura Lambas-Senas, Helene Scarna, and Nasser Haddjeri. 2009. “Therapeutic Potential of 5-HT₇ Receptors in Mood Disorders.” *Current Drug Targets* 10 (11): 1109–17. doi:10.2174/138945009789735129.
- Monkul, E. S., J. P. Hatch, M. A. Nicoletti, S. Spence, P. Brambilla, A. L. T. Lacerda, R. B. Sassi, A. G. Mallinger, M. S. Keshavan, and J. C. Soares. 2006. “Fronto-Limbic Brain Structures in Suicidal and Non-Suicidal Female Patients with Major Depressive Disorder.” *Molecular Psychiatry* 12 (4): 360–66. doi:10.1038/sj.mp.4001919.

- Monsma, F. J., Y. Shen, R. P. Ward, M. W. Hamblin, and D. R. Sibley. 1993. "Cloning and Expression of a Novel Serotonin Receptor with High Affinity for Tricyclic Psychotropic Drugs." *Molecular Pharmacology* 43 (3): 320–27.
- Monteleone, P., C. Serritella, V. Martiadis, and M. Maj. 2008. "Decreased Levels of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor in Both Depressed and Euthymic Patients with Unipolar Depression and in Euthymic Patients with Bipolar I and II Disorders." *Bipolar Disorders* 10 (1): 95–100. doi:10.1111/j.1399-5618.2008.00459.x.
- Montgomery, S. A., J. Henry, G. McDonald, T. Dinan, M. Lader, I. Hindmarch, A. Clare, and D. Nutt. 1994. "Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Meta-Analysis of Discontinuation Rates." *International Clinical Psychopharmacology* 9 (1): 47–53.
- Murakami, K, A Fellous, E E Baulieu, and P Robel. 2000. "Pregnenolone Binds to Microtubule-Associated Protein 2 and Stimulates Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3579–84.
- Myers, Brent, Jessica M. McKlveen, and James P. Herman. 2014. "Glucocorticoid Actions on Synapses, Circuits, and Behavior: Implications for the Energetics of Stress." *Frontiers in Neuroendocrinology*, CRH/Stress in Honor of Wylie Vale, 35 (2): 180–96. doi:10.1016/j.yfrne.2013.12.003.
- Nemeroff, Charles B, and Wylie W Vale. 2005. "The Neurobiology of Depression: Inroads to Treatment and New Drug Discovery." *The Journal of Clinical Psychiatry* 66 Suppl 7: 5–13.
- Niswender, Colleen M., Katherine Herrick-Davis, Ginney E. Dilley, Herbert Y. Meltzer, James C. Overholser, Craig A. Stockmeier, Ronald B. Emeson, and Elaine Sanders-Bush. 2001. "RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT_{2C} Receptor: Alterations in Suicide and Implications for Serotonergic Pharmacotherapy." *Neuropsychopharmacology* 24 (5): 478–91. doi:10.1016/S0893-133X(00)00223-2.
- North, Brian J., Brett L. Marshall, Margie T. Borra, John M. Denu, and Eric Verdin. 2003. "The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase." *Molecular Cell* 11 (2): 437–44. doi:10.1016/S1097-2765(03)00038-8.
- Novacek, Michael J. 1992. "Mammalian Phylogeny: Shaking the Tree." *Nature* 356 (6365): 121–25. doi:10.1038/356121a0.
- O'Connell, Christopher B., and Alexey L. Khodjakov. 2007. "Cooperative Mechanisms of Mitotic Spindle Formation." *Journal of Cell Science* 120 (10): 1717–22. doi:10.1242/jcs.03442.
- Ohl, F., C. Kirschbaum, and E. Fuchs. 1999. "Evaluation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity in the Tree Shrew (*Tupaia Belangeri*) via Salivary Cortisol Measurement." *Laboratory Animals* 33 (3): 269–74. doi:10.1258/002367799780578237.
- Ohl, F, T Michaelis, G. K Vollmann-Honsdorf, C Kirschbaum, and E Fuchs. 2000. "Effect of Chronic Psychosocial Stress and Long-Term Cortisol Treatment on Hippocampus-

- Mediated Memory and Hippocampal Volume: A Pilot-Study in Tree Shrews.” *Psychoneuroendocrinology* 25 (4): 357–63. doi:10.1016/S0306-4530(99)00062-1.
- Ohl, Frauke, and Eberhard Fuchs. 1999. “Differential Effects of Chronic Stress on Memory Processes in the Tree Shrew.” *Cognitive Brain Research* 7 (3): 379–87. doi:10.1016/S0926-6410(98)00042-1.
- Oka, T, K Oka, and T Hori. 2001. “Mechanisms and Mediators of Psychological Stress-Induced Rise in Core Temperature.” *Psychosomatic Medicine* 63 (3): 476–86.
- O’Mahony, Cliona M., Gerard Clarke, Sinead Gibney, Timothy G. Dinan, and John F. Cryan. 2011. “Strain Differences in the Neurochemical Response to Chronic Restraint Stress in the Rat: Relevance to Depression.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 97 (4): 690–99. doi:10.1016/j.pbb.2010.11.012.
- O’Neil, Michael F., and Nicholas A. Moore. 2003. “Animal Models of Depression: Are There Any?” *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 18 (4): 239–54. doi:10.1002/hup.496.
- Ordway, G A, K S Smith, and J W Haycock. 1994. “Elevated Tyrosine Hydroxylase in the Locus Coeruleus of Suicide Victims.” *Journal of Neurochemistry* 62 (2): 680–85.
- Ordway, G A, P S Widdowson, K S Smith, and A Halaris. 1994. “Agonist Binding to Alpha 2-Adrenoceptors Is Elevated in the Locus Coeruleus from Victims of Suicide.” *Journal of Neurochemistry* 63 (2): 617–24.
- Organisation Mondiale de la Santé. 2012. “OMS | Plan D’action Pour La Santé Mentale 2013-2020.” *WHO*. http://www.who.int/mental_health/action_plan_2013/fr/.
- Organisation Mondiale de la Santé. 2014. “OMS | La Dépression.” *WHO*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/fr/>.
- Otte, C. 2005. “Depressive Symptoms and 24-Hour Urinary Norepinephrine Excretion Levels in Patients With Coronary Disease: Findings From the Heart and Soul Study.” *American Journal of Psychiatry* 162 (11): 2139–45. doi:10.1176/appi.ajp.162.11.2139.
- Pacheco, M A, C Stockmeier, H Y Meltzer, J C Overholser, G E Dilley, and R S Jope. 1996. “Alterations in Phosphoinositide Signaling and G-Protein Levels in Depressed Suicide Brain.” *Brain Research* 723 (1-2): 37–45.
- Page, Michelle E., John F. Cryan, Arthur Sullivan, Ashutosh Dalvi, Berangere Saucy, David R. Manning, and Irwin Lucki. 2002. “Behavioral and Neurochemical Effects of 5-[4-[4-(5-Cyano-3-Indolyl)-Butyl]-Butyl]-1-Piperazinyl}-Benzofuran-2-Carboxamide (EMD 68843): A Combined Selective Inhibitor of Serotonin Reuptake and 5-Hydroxytryptamine_{1A} Receptor Partial Agonist.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302 (3): 1220–27. doi:10.1124/jpet.102.034280.
- Papp, Mariusz, Annick Vassout, and Conrad Gentsch. 2000. “The NK1-Receptor Antagonist NKP608 Has an Antidepressant-like Effect in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats.” *Behavioural Brain Research* 115 (1): 19–23. doi:10.1016/S0166-4328(00)00230-8.

- Pardon, Marie-Christine, Shuaike Ma, and David A. Morilak. 2003. "Chronic Cold Stress Sensitizes Brain Noradrenergic Reactivity and Noradrenergic Facilitation of the HPA Stress Response in Wistar Kyoto Rats." *Brain Research* 971 (1): 55–65.
- Paré, William P. 1993. "Passive-Avoidance Behavior in Wistar-Kyoto (WKY), Wistar, and Fischer-344 Rats." *Physiology & Behavior* 54 (5): 845–52. doi:10.1016/0031-9384(93)90291-M.
- Paré, W. P. 1989. "Stress Ulcer Susceptibility and Depression in Wistar Kyoto (WKY) Rats." *Physiology & Behavior* 46 (6): 993–98.
- Paré, W. P., and E. Redei. 1993. "Depressive Behavior and Stress Ulcer in Wistar Kyoto Rats." *Journal of Physiology-Paris* 87 (4): 229–38. doi:10.1016/0928-4257(93)90010-Q.
- Pariante, Carmine M, and Stafford L Lightman. 2008. "The HPA Axis in Major Depression: Classical Theories and New Developments." *Trends in Neurosciences* 31 (9): 464–68. doi:10.1016/j.tins.2008.06.006.
- Pepin, Marie-Claude, Francois Pothier, and Nicholas Barden. 1992. "Impaired Type II Glucocorticoid-Receptor Function in Mice Bearing Antisense RNA Transgene." *Nature* 355 (6362): 725–28. doi:10.1038/355725a0.
- Peris, Leticia, Manuel Thery, Julien Fauré, Yasmina Saoudi, Laurence Lafanechère, John K. Chilton, Phillip Gordon-Weeks, et al. 2006. "Tubulin Tyrosination Is a Major Factor Affecting the Recruitment of CAP-Gly Proteins at Microtubule plus Ends." *The Journal of Cell Biology* 174 (6): 839–49. doi:10.1083/jcb.200512058.
- Peris, Leticia, Michael Wagenbach, Laurence Lafanechère, Jacques Brocard, Ayana T. Moore, Frank Kozielski, Didier Job, Linda Wordeman, and Annie Andrieux. 2009. "Motor-Dependent Microtubule Disassembly Driven by Tubulin Tyrosination." *The Journal of Cell Biology* 185 (7): 1159–66. doi:10.1083/jcb.200902142.
- Pezawas, Lukas, Andreas Meyer-Lindenberg, Emily M Drabant, Beth A Verchinski, Karen E Munoz, Bhaskar S Kolachana, Michael F Egan, Venkata S Mattay, Ahmad R Hariri, and Daniel R Weinberger. 2005. "5-HTTLPR Polymorphism Impacts Human Cingulate-Amygdala Interactions: A Genetic Susceptibility Mechanism for Depression." *Nature Neuroscience* 8 (6): 828–34. doi:10.1038/nn1463.
- Pilcher, J J, and A I Huffcutt. 1996. "Effects of Sleep Deprivation on Performance: A Meta-Analysis." *Sleep* 19 (4): 318–26.
- Plaut, S M, and S B Friedman. 1982. "Stress, Coping Behavior and Resistance to Disease." *Psychotherapy and Psychosomatics* 38 (1): 274–83.
- Porsolt, R. D., A. Bertin, and M. Jalfre. 1977. "Behavioral Despair in Mice: A Primary Screening Test for Antidepressants." *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie* 229 (2): 327–36.
- Price, Rebecca B., Matthew K. Nock, Dennis S. Charney, and Sanjay J. Mathew. 2009. "Effects of Intravenous Ketamine on Explicit and Implicit Measures of Suicidality in

- Treatment-Resistant Depression.” *Biological Psychiatry*, Medical Consequences and Contributions to Depression, 66 (5): 522–26. doi:10.1016/j.biopsych.2009.04.029.
- Purdy, R. H., A. L. Morrow, P. H. Moore, and S. M. Paul. 1991. “Stress-Induced Elevations of Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor-Active Steroids in the Rat Brain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (10): 4553–57. doi:10.1073/pnas.88.10.4553.
- Racagni, Giorgio, Marco Andrea Riva, Raffaella Molteni, Laura Musazzi, Francesca Calabrese, Maurizio Popoli, and Daniela Tardito. 2011. “Mode of Action of Agomelatine: Synergy between Melatonergic and 5-HT_{2C} Receptors.” *The World Journal of Biological Psychiatry* 12 (8): 574–87. doi:10.3109/15622975.2011.595823.
- Rajkowska, Grazyna. 2000. “Histopathology of the Prefrontal Cortex in Major Depression: What Does It Tell Us about Dysfunctional Monoaminergic Circuits?” In *Progress in Brain Research*, edited by G.G. van Eden, J.P.C. de Bruin, M.G.P. Feenstra, C.M.A. Pennartz H.B.M. Uylings, Volume 126:397–412. Cognition, Emotion and Autonomic Responses: The Integrative Role of the Prefrontal Cortex and Limbic Structures. Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612300260263>.
- Rajkumar, R., J. Fam, E. Y. M. Yeo, and G. S. Dawe. 2015. “Ketamine and Suicidal Ideation in Depression: Jumping the Gun?” *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 99 (May): 23–35. doi:10.1016/j.phrs.2015.05.003.
- Ratti, Emiliangelo, Kevin Bellew, Paolo Bettica, Heather Bryson, Stefano Zamuner, Graeme Archer, Lisa Squassante, et al. 2011. “Results from 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Studies of the Novel NK1 Receptor Antagonist Casopitant in Patients with Major Depressive Disorder.” *Journal of Clinical Psychopharmacology* 31 (6): 727–33. doi:10.1097/JCP.0b013e31823608ca.
- Redeker, V., N. Levilliers, J. M. Schmitter, J. P. Le Caer, J. Rossier, A. Adoutte, and M. H. Bré. 1994. “Polyglycylation of Tubulin: A Posttranslational Modification in Axonemal Microtubules.” *Science (New York, N.Y.)* 266 (5191): 1688–91.
- Ritsner, Michael S., Hisham Bawakny, and Anatoly Kreinin. 2014. “Pregnenolone Treatment Reduces Severity of Negative Symptoms in Recent-Onset Schizophrenia: An 8-Week, Double-Blind, Randomized Add-on Two-Center Trial.” *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 68 (6): 432–40. doi:10.1111/pcn.12150.
- Ritsner, M. S. 2011. “The Clinical and Therapeutic Potentials of Dehydroepiandrosterone and Pregnenolone in Schizophrenia.” *Neuroscience* 191 (September): 91–100. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.017.
- Roberts, Anthony J., Takahide Kon, Peter J. Knight, Kazuo Sutoh, and Stan A. Burgess. 2013. “Functions and Mechanics of Dynein Motor Proteins.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (11): 713–26. doi:10.1038/nrm3667.

- Rochlin, M. William, Karen M. Wickline, and Paul C. Bridgman. 1996. "Microtubule Stability Decreases Axon Elongation but Not Axoplasm Production." *The Journal of Neuroscience* 16 (10): 3236–46.
- Romeo, Elena, Andreas Ströhle, Gianfranco Spalletta, Flavia di Michele, Bettina Hermann, Florian Holsboer, Augusto Pasini, and Rainer Rupprecht. 1998. "Effects of Antidepressant Treatment on Neuroactive Steroids in Major Depression." *American Journal of Psychiatry* 155 (7): 910–13.
- Roth, Tania L., Phillip R. Zoladz, J. David Sweatt, and David M. Diamond. 2011. "Epigenetic Modification of Hippocampal Bdnf DNA in Adult Rats in an Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder." *Journal of Psychiatric Research* 45 (7): 919–26. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.01.013.
- Rupniak, Nadia M. J. 2002. "New Insights into the Antidepressant Actions of Substance P (NK1 Receptor) Antagonists." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80 (5): 489–94.
- Rush, M.D., A., M.D., Madhukar Trivedi, Ph.D., Stephen Wisniewski, M.D., Andrew Nierenberg, M.D., Jonathan Stewart, Ph.D., M.B.A., Diane Warden, Ph.D., George Niederehe, et al. 2006. "Acute and Longer-Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps: A STAR*D Report." *American Journal of Psychiatry* 163 (11): 1905–17. doi:10.1176/appi.ajp.163.11.1905.
- Sánchez, C, J Díaz-Nido, and J Avila. 2000. "Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) and Its Relevance for the Regulation of the Neuronal Cytoskeleton Function." *Progress in Neurobiology* 61 (2): 133–68. doi:10.1016/S0301-0082(99)00046-5.
- Sapolsky RM. 2000. "Glucocorticoids and Hippocampal Atrophy in Neuropsychiatric Disorders." *Archives of General Psychiatry* 57 (10): 925–35. doi:10.1001/archpsyc.57.10.925.
- Sargent, P. A., K. H. Kjaer, C. J. Bench, E. A. Rabiner, C. Messa, J. Meyer, R. N. Gunn, P. M. Grasby, and P. J. Cowen. 2000. "Brain serotonin1A Receptor Binding Measured by Positron Emission Tomography with [11C]WAY-100635: Effects of Depression and Antidepressant Treatment." *Archives of General Psychiatry* 57 (2): 174–80.
- Schiller, Crystal Edler, Peter J. Schmidt, and David R. Rubinow. 2014. "Allopregnanolone as a Mediator of Affective Switching in Reproductive Mood Disorders." *Psychopharmacology* 231 (17): 3557–67. doi:10.1007/s00213-014-3599-x.
- Schmelting, Barthel, Silke Corbach-Söhle, Susan Kohlhaase, Christina Schlumbohm, Gabriele Flügge, and Eberhard Fuchs. 2014a. "Agomelatine in the Tree Shrew Model of Depression: Effects on Stress-Induced Nocturnal Hyperthermia and Hormonal Status." *European Neuropsychopharmacology* 24 (3): 437–47. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.07.010.
- Schmelting, Barthel, Silke Corbach-Söhle, Susan Kohlhaase, Christina Schlumbohm, Gabriele Flügge, and Eberhard Fuchs. 2014b. "Agomelatine in the Tree Shrew Model

- of Depression: Effects on Stress-Induced Nocturnal Hyperthermia and Hormonal Status.” *European Neuropsychopharmacology* 24 (3): 437–47. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.07.010.
- Schmidt, Heath, and Ronald Duman. 2007. “The Role of Neurotrophic Factors in Adult Hippocampal Neurogenesis, Antidepressant Treatments and Animal Models of Depressive-like Behavior.” *Behavioural Pharmacology* September 2007, 5–6. doi:10.1097/FBP.0b013e3282ee2aa8.
- Schmidt, M V, S H Scharf, V Sterlemann, K Ganea, C Liebl, F Holsboer, and M B Müller. 2010. “High Susceptibility to Chronic Social Stress Is Associated with a Depression-like Phenotype.” *Psychoneuroendocrinology* 35 (5): 635–43. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.10.002.
- Selye, Hans. 1936. “A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents : Abstract : Nature.” July 4. <http://www.nature.com/nature/journal/v138/n3479/abs/138032a0.html>.
- Selye, Hans. 1941. “Anesthetic Effect of Steroid Hormones.” *Experimental Biology and Medicine* 46 (1): 116–21. doi:10.3181/00379727-46-11907.
- Selye, Hans. 1956. “Stress and Psychiatry.” *American Journal of Psychiatry* 113 (5): 423–27.
- Selye, Hans. 1976. “Forty Years of Stress Research: Principal Remaining Problems and Misconceptions.” *Canadian Medical Association Journal* 115 (1): 53.
- Sen, Srijan, Ronald Duman, and Gerard Sanacora. 2008. “Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Antidepressant Medications: Meta-Analyses and Implications.” *Biological Psychiatry* 64 (6): 527–32. doi:10.1016/j.biopsych.2008.05.005.
- Sheline, Yvette I. 2000. “3D MRI Studies of Neuroanatomic Changes in Unipolar Major Depression: The Role of Stress and Medical Comorbidity.” *Biological Psychiatry* 48 (8): 791–800. doi:10.1016/S0006-3223(00)00994-X.
- Shida, Toshinobu, Juan G. Cueva, Zhenjie Xu, Miriam B. Goodman, and Maxence V. Nachury. 2010. “The Major γ -Tubulin K40 Acetyltransferase γ TAT1 Promotes Rapid Ciliogenesis and Efficient Mechanosensation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21517–22. doi:10.1073/pnas.1013728107.
- Shimizu, Hiromitsu, Yoshimi Iwayama, Kazuo Yamada, Tomoko Toyota, Yoshio Minabe, Kauhiko Nakamura, Mizuho Nakajima, et al. 2006. “Genetic and Expression Analyses of the STOP (MAP6) Gene in Schizophrenia.” *Schizophrenia Research* 84 (2–3): 244–52. doi:10.1016/j.schres.2006.03.017.
- Shopsin B, Friedman E, and Gershon S. 1976. “PARachlorophenylalanine Reversal of Tranylcypromine Effects in Depressed Patients.” *Archives of General Psychiatry* 33 (7): 811–19. doi:10.1001/archpsyc.1976.01770070041003.

- Shopsin, B., S. Gershon, M. Goldstein, E. Friedman, and S. Wilk. 1975. "Use of Synthesis Inhibitors in Defining a Role for Biogenic Amines during Imipramine Treatment in Depressed Patients." *Psychopharmacology Communications* 1 (2): 239–49.
- Steiger, A, M Dresler, M Kluge, and P Schüssler. 2013. "Pathology of Sleep, Hormones and Depression." *Pharmacopsychiatry* 46 Suppl 1 (May): S30–35. doi:10.1055/s-0033-1337921.
- Stockmeier, Craig A., Laura A. Shapiro, Ginny E. Dilley, Tamara N. Kolli, Lee Friedman, and Grazyna Rajkowska. 1998. "Increase in Serotonin-1A Autoreceptors in the Midbrain of Suicide Victims with Major Depression—Postmortem Evidence for Decreased Serotonin Activity." *The Journal of Neuroscience* 18 (18): 7394–7401.
- Stratakis, C. A., and G. P. Chrousos. 1995. "Neuroendocrinology and Pathophysiology of the Stress System." *Annals of the New York Academy of Sciences* 771 (December): 1–18.
- Ströhle, Andreas, Augusto Pasini, Elena Romeo, Bettina Hermann, Gianfranco Spalletta, Flavia di Michele, Florian Holsboer, and Rainer Rupprecht. 2000. "Fluoxetine Decreases Concentrations of 3 α ,5 α -Tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) in Major Depression." *Journal of Psychiatric Research* 34 (3): 183–86. doi:10.1016/S0022-3956(00)00006-6.
- Ströhle, Andreas, Elena Romeo, Bettina Hermann, Augusto Pasini, Gianfranco Spalletta, Flavia di Michele, Florian Holsboer, and Rainer Rupprecht. 1999. "Concentrations of 3 α -Reduced Neuroactive Steroids and Their Precursors in Plasma of Patients with Major Depression and after Clinical Recovery." *Biological Psychiatry* 45 (3): 274–77. doi:10.1016/S0006-3223(98)00328-X.
- Szyk, Agnieszka, Alexandra M. Deaconescu, Jeffrey Spector, Benjamin Goodman, Max L. Valenstein, Natasza E. Ziolkowska, Vasilisa Kormendi, Nikolaus Grigorieff, and Antonina Roll-Mecak. 2014. "Molecular Basis for Age-Dependent Microtubule Acetylation by Tubulin Acetyltransferase." *Cell* 157 (6): 1405–15. doi:10.1016/j.cell.2014.03.061.
- Tatarczyńska, Ewa, Aleksandra Kłodzińska, Ewa Chojnacka-Wójcik, Agnieszka Pałucha, Fabrizio Gasparini, Rainer Kuhn, and Andrzej Pilc. 2001. "Potential Anxiolytic- and Antidepressant-like Effects of MPEP, a Potent, Selective and Systemically Active mGlu5 Receptor Antagonist." *British Journal of Pharmacology* 132 (7): 1423–30. doi:10.1038/sj.bjp.0703923.
- Tejani-Butt, Shanaz, Joseph Kluczynski, and William P. Paré. 2003. "Strain-Dependent Modification of Behavior Following Antidepressant Treatment." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (1): 7–14.
- Tizabi, Yousef, Sheketha R. Hauser, Khandra Y. Tyler, Bruk Getachew, Reza Madani, Yukti Sharma, and Kebreten F. Manaye. 2010. "Effects of Nicotine on Depressive-like Behavior and Hippocampal Volume of Female WKY Rats." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34 (1): 62–69. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.09.024.

- Touma, Chadi, Mirjam Bunck, Lisa Glasl, Markus Nussbaumer, Rupert Palme, Hendrik Stein, Michael Wolferstätter, et al. 2008. "Mice Selected for High versus Low Stress Reactivity: A New Animal Model for Affective Disorders." *Psychoneuroendocrinology* 33 (6): 839–62. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.03.013.
- Trivedi, Madhukar H., A. John Rush, Stephen R. Wisniewski, Andrew A. Nierenberg, Diane Warden, Louise Ritz, Grayson Norquist, et al. 2006. "Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR*D: Implications for Clinical Practice." *American Journal of Psychiatry* 163 (1): 28–40. doi:10.1176/appi.ajp.163.1.28.
- Tsankova, Nadia M., Olivier Berton, William Renthal, Arvind Kumar, Rachel L. Neve, and Eric J. Nestler. 2006. "Sustained Hippocampal Chromatin Regulation in a Mouse Model of Depression and Antidepressant Action." *Nature Neuroscience* 9 (4): 519–25. doi:10.1038/nn1659.
- Tsankova, Nadia M., Arvind Kumar, and Eric J. Nestler. 2004. "Histone Modifications at Gene Promoter Regions in Rat Hippocampus after Acute and Chronic Electroconvulsive Seizures." *The Journal of Neuroscience* 24 (24): 5603–10. doi:10.1523/JNEUROSCI.0589-04.2004.
- Tuttle, Russell H. 1991. "Primate Origins and Evolution. By R. D. Martin. Princeton, NJ: Princeton University Press. 1990. ISBN 0-691-08565-X. " *American Journal of Physical Anthropology* 85 (2): 243–44. doi:10.1002/ajpa.1330850217.
- Uzunova, Veska, Luther Sampson, and Doncho P. Uzunov. 2006. "Relevance of Endogenous 3 α -Reduced Neurosteroids to Depression and Antidepressant Action." *Psychopharmacology* 186 (3): 351–61. doi:10.1007/s00213-005-0201-6.
- Uzunova, V., Y. Sheline, J. M. Davis, A. Rasmusson, D. P. Uzunov, E. Costa, and A. Guidotti. 1998. "Increase in the Cerebrospinal Fluid Content of Neurosteroids in Patients with Unipolar Major Depression Who Are Receiving Fluoxetine or Fluvoxamine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 3239–44.
- Vale, Ronald D., Thomas S. Reese, and Michael P. Sheetz. 1985. "Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility." *Cell* 42 (1): 39–50. doi:10.1016/S0092-8674(85)80099-4.
- Van der Hart, Marieke G C. 2002. "Substance P Receptor Antagonist and Clomipramine Prevent Stress-Induced Alterations in Cerebral Metabolites, Cytogenesis in the Dentate Gyrus and Hippocampal Volume." , *Published Online: 24 October 2002*; / doi:10.1038/sj.mp.4001130 7 (9). doi:10.1038/sj.mp.4001130.
- Van der Hart, Marieke G C, Gabriel de Biurrun, Boldizsár Czéh, Nadia M J Rupniak, Johan A den Boer, and Eberhard Fuchs. 2005. "Chronic Psychosocial Stress in Tree Shrews: Effect of the Substance P (NK1 Receptor) Antagonist L-760735 and Clomipramine on Endocrine and Behavioral Parameters." *Psychopharmacology* 181 (2): 207–16. doi:10.1007/s00213-005-2260-0.

- Van de Velde, Sarah, Piet Bracke, and Katia Levecque. 2010. "Gender Differences in Depression in 23 European Countries. Cross-National Variation in the Gender Gap in Depression." *Social Science & Medicine* (1982) 71 (2): 305–13. doi:10.1016/j.socscimed.2010.03.035.
- Van Kampen, Marja, E. Ronald De Kloet, Gabriele Flügge, and Eberhard Fuchs. 2002. "Blockade of Glucocorticoid Receptors with ORG 34116 Does Not Normalize Stress-Induced Symptoms in Male Tree Shrews." *European Journal of Pharmacology* 457 (2–3): 207–16. doi:10.1016/S0014-2999(02)02664-X.
- Van Kampen, Marja, Ulrich Schmitt, Christoph Hiemke, and Eberhard Fuchs. 2000. "Diazepam Has No Beneficial Effects on Stress-Induced Behavioural and Endocrine Changes in Male Tree Shrews." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65 (3): 539–46. doi:10.1016/S0091-3057(99)00190-2.
- Varty, Geoffrey B., Mary E. Cohen-Williams, Cynthia A. Morgan, Ursula Pylak, Ruth A. Duffy, Jean E. Lachowicz, Galen J. Carey, and Vicki L. Coffin. 2002. "The Gerbil Elevated Plus-Maze II: Anxiolytic-like Effects of Selective Neurokinin NK1 Receptor Antagonists." *Neuropsychopharmacology* 27 (3): 371–79. doi:10.1016/S0893-133X(02)00313-5.
- Vialou, Vincent, Jian Feng, Alfred J. Robison, and Eric J. Nestler. 2013. "Epigenetic Mechanisms of Depression and Antidepressant Action." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53 (1): 59–87. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134540.
- Vidal, Rebeca, Elena Castro, Fuencisla Pilar-Cuéllar, Jesús Pascual-Brazo, Alvaro Díaz, María Luisa Rojo, Raquel Linge, Alicia Martín, Elsa M. Valdizán, and Angel Pazos. 2014. "Serotonin 5-HT₄ Receptors: A New Strategy for Developing Fast Acting Antidepressants?" *Current Pharmaceutical Design* 20 (23): 3751–62.
- Videbech, Poul, and Barbara Ravnkilde. 2004. "Hippocampal Volume and Depression: A Meta-Analysis of MRI Studies." *The American Journal of Psychiatry* 161 (11): 1957–66. doi:10.1176/appi.ajp.161.11.1957.
- Villanueva, Rosa. 2013. "Neurobiology of Major Depressive Disorder." *Neural Plasticity* 2013 (October). doi:10.1155/2013/873278.
- Vinkers, Christiaan H., Meg J. V. van Bogaert, Marianne Klanker, S. Mechiel Korte, Ronald Oosting, Taleen Hanania, Seth C. Hopkins, Berend Olivier, and Lucianne Groenink. 2008. "Translational Aspects of Pharmacological Research into Anxiety Disorders: The Stress-Induced Hyperthermia (SIH) Paradigm." *European Journal of Pharmacology*, 100 Years of Pharmacology in The Netherlands, 585 (2–3): 407–25. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.097.
- Wade, Richard H. 2009. "On and around Microtubules: An Overview." *Molecular Biotechnology* 43 (2): 177–91. doi:10.1007/s12033-009-9193-5.
- Walczak, Claire E., and Rebecca Heald. 2008. "Chapter Three - Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function." In *International Review of Cytology*, edited by

- Kwang W. Jeon, Volume 265:111–58. *A Survey of Cell Biology*. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769607650037>.
- Wang, Jing, Anping Chai, Qixin Zhou, Longbao Lv, Liping Wang, Yuexiong Yang, and Lin Xu. 2013. “Chronic Clomipramine Treatment Reverses Core Symptom of Depression in Subordinate Tree Shrews.” Edited by Yong-Gang Yao. *PLoS ONE* 8 (12): e80980. doi:10.1371/journal.pone.0080980.
- Weaver, Ian C G, Nadia Cervoni, Frances A Champagne, Ana C D’Alessio, Shakti Sharma, Jonathan R Seckl, Sergiy Dymov, Moshe Szyf, and Michael J Meaney. 2004. “Epigenetic Programming by Maternal Behavior.” *Nature Neuroscience* 7 (8): 847–54. doi:10.1038/nn1276.
- Webster, D. R., and G. G. Borisy. 1989. “Microtubules Are Acetylated in Domains That Turn over Slowly.” *Journal of Cell Science* 92 (1): 57–65.
- Webster, D. R., G. G. Gundersen, J. C. Bulinski, and G. G. Borisy. 1987. “Differential Turnover of Tyrosinated and Detyrosinated Microtubules.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24): 9040.
- Weissman, M M, R C Bland, G J Canino, C Faravelli, S Greenwald, H G Hwu, P R Joyce, et al. 1996. “Cross-National Epidemiology of Major Depression and Bipolar Disorder.” *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 276 (4): 293–99.
- West, A. P. 1990. “Neurobehavioral Studies of Forced Swimming: The Role of Learning and Memory in the Forced Swim Test.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 14 (6): 863–77.
- Willets, Joyce, Robert L. Balster, and J. David Leander. 1990. “The Behavioral Pharmacology of NMDA Receptor Antagonists.” *Trends in Pharmacological Sciences* 11 (10): 423–28. doi:10.1016/0165-6147(90)90150-7.
- Willner, P, and P J Mitchell. 2002. “The Validity of Animal Models of Predisposition to Depression.” *Behavioural Pharmacology* 13 (3): 169–88.
- Yamamoto, H, K Fukunaga, E Tanaka, and E Miyamoto. 1983. “Ca²⁺- and Calmodulin-Dependent Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein 2 and Tau Factor, and Inhibition of Microtubule Assembly.” *Journal of Neurochemistry* 41 (4): 1119–25.
- Yang, Can, Gaohua Wang, Huiling Wang, Zhongchun Liu, and Xiaoping Wang. 2009. “Cytoskeletal Alterations in Rat Hippocampus Following Chronic Unpredictable Mild Stress and Re-Exposure to Acute and Chronic Unpredictable Mild Stress.” *Behavioural Brain Research* 205 (2): 518–24. doi:10.1016/j.bbr.2009.08.008.
- Yüksel, Cagri, and Dost Öngür. 2010. “Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Glutamate-Related Abnormalities in Mood Disorders.” *Biological Psychiatry, Glutamate in Mood Disorders*, 68 (9): 785–94. doi:10.1016/j.biopsych.2010.06.016.
- Zarate CA, Jr, Singh JB, Carlson PJ, and et al. 2006. “A Randomized Trial of an N-Methyl-D-Aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression.” *Archives of General Psychiatry* 63 (8): 856–64. doi:10.1001/archpsyc.63.8.856.

Zhang, Xiaodong, Raul R. Gainetdinov, Jean-Martin Beaulieu, Tatyana D. Sotnikova, Luranell H. Burch, Redford B. Williams, David A. Schwartz, K. Ranga R. Krishnan, and Marc G. Caron. 2005. "Loss-of-Function Mutation in Tryptophan Hydroxylase-2 Identified in Unipolar Major Depression." *Neuron* 45 (1): 11–16. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.014.